

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle der TGF- β -aktivierten Kinase 1 im Hepatozellulären Karzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lana Louisa Urbansky
aus Fürth

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

20. Juni 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Literaturdiskussion	1
1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC).....	1
1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Klinik des HCCs	1
1.1.2 Diagnostik.....	2
1.1.3 Therapie	7
1.1.4 Prognose	8
1.1.5 Pathogenese	9
1.2 Einordnung von TAK1 in den NF- κ B-Signalweg.....	11
1.2.1 Der NF- κ B-Signalweg	12
1.2.2 Struktur von TAK1	15
1.2.3 Bedeutung von TAK1 für die Karzinogenese und speziell für das HCC	19
1.3 Ziel der Dissertation.....	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Reagenzien	23
2.1.4 Kits	25
2.1.5 Standards, Größenmarker	25
2.1.6 Puffer und Medien	26
2.1.7 Antikörper und Enzyme	27
2.1.8 Vektoren.....	29
2.1.9 Nukleinsäuren.....	29
2.1.10 Zelllinien	30
2.1.11 Software	31
2.2 Mikroskopische Methoden	32
2.2.1 Gewebekollektiv	32
2.2.2 Immunhistochemie.....	33
2.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	35
2.2.4 Statistische Auswertung	37
2.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	39
2.3.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	39
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	41
2.3.4 DNA-Gelextraktion aus einem Agarosegel.....	41
2.3.5 Ligation.....	41

2.3.6	Plasmid-DNA-Isolierung („Miniprep“)	42
2.3.7	Transformation	42
2.3.8	Restriktionsverdau	43
2.3.9	Kolonie-PCR	43
2.3.10	Sequenzierung	44
2.3.11	Glycerinkultur	44
2.3.12	Plasmid-DNA-Isolierung („Midiprep“)	44
2.3.13	Quantitative PCR (qPCR)	45
2.3.14	Semiquantitative PCR	46
2.4	Zellbiologische Methoden	47
2.4.1	Zelllinien und deren Kultivierung	47
2.4.2	Expandieren von Zellen	47
2.4.3	Zellzahlbestimmung und Ausbringen von Zellen	48
2.4.4	Transiente Transfektion mit PEI-PBS	48
2.4.5	Migrationsassay	49
2.4.6	Proliferationsassay	50
2.5	Proteinbiochemische Methoden	50
2.5.1	Zellernte, Zellyse und Fraktionierung	50
2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford	51
2.5.3	SDS-Gelelektrophorese	52
2.5.4	Immunblot	53
2.5.5	Entwicklung	53
2.5.6	Densitometrische Auswertung	54
3	Ergebnisse	55
3.1	Induktion von TAK1 in HCC-Primarien und -Metastasen	55
3.1.1	TAK1 in humanem Lebergewebe	55
3.1.2	TAK1 in HCC-Metastasen	56
3.1.3	TAK1-Proteinexpression in HCC und Lebergewebe	57
3.2	Untersuchung der TAK1-Isoformen	59
3.2.1	TAK1-Isoformen im Immunblot	59
3.2.2	TAK1-Isoformen in semiquantitativer PCR-Analyse	59
3.2.3	TAK1-Isoformen in der qPCR-Analyse	60
3.2.4	Kontrolle von TAK1-Überexpressionskonstrukten in Zellkultur	61
3.3	TAK1 Δ E12-vermittelte Induktion der Zellmigration	62
3.4	Einfluss von TAK1 auf Apoptose und Proliferation	63
3.5	Klinisch-prognostische Wertigkeit der TAK1-Expression im HCC	65
3.5.1	Assoziation der TAK1-Expression mit dem Gesamtüberleben	65
3.5.2	Assoziation der TAK1-Expression mit weiteren klinischen Parametern	67
3.5.3	Assoziation der TAK1-Expression mit pathologischen Parametern	69
3.5.4	Assoziation der TAK1-Expression im HCC mit Gefäßinvasion	71

3.6	Subzelluläre Lokalisation von TAK1	72
3.6.1	TAK1-Immunhistochemie.....	72
3.6.2	Lokalisation von TAK1 in HCC-Zellkulturen	73
3.6.3	Lokalisationsstudie von TAK1 in Huh7-Zelllinien mittels Zellfraktionierung und Immunblot.....	74
3.6.4	Analyse von TAK1 nach nukleärer und zytoplasmatischer Fraktionierung	74
3.7	Die Rolle von TAK1 im alternativen NF- κ B-Signalweg	76
4	Diskussion.....	79
4.1	Induktion von TAK1 im HCC und dessen Einfluss auf das Patientenüberleben	79
4.2	Mögliche Mechanismen der höheren Aggressivität von HCCs mit hoher TAK1-Expression.....	81
4.3	Alternatives Spleißen von TAK1	85
4.4	Intrahepatische Expression und intrazelluläre Lokalisation von TAK1	85
4.5	Fazit und Ausblick.....	88
5	Zusammenfassung.....	90
6	Literaturverzeichnis	92
7	Anhang	CI
7.1	Vektoren	CI
7.2	Kollektiv	CII
7.3	Kaplan-Meier-Kurven.....	CIV
8	Danksagung.....	CV
9	Tabellarischer Lebenslauf	CVI

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFP	alpha-Fetoprotein
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
Ang2	Angiopoietin-2
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASH	alkoholische Steatohepatitis
ATM	Ataxia-Teleangiektasia-mutierte Kinase
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor der TNF-Familie
BC	<i>B-Cell</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma-2</i>
BCLC-Stadium	<i>Barcelona Clinic Liver Cancer-Stadium</i>
Bcl-x(L)	<i>B-Cell Lymphoma-Extra Large</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD40L	<i>Cluster-of-Differentiation-40-Ligand</i>
c-FLIP	<i>Cellular-FLICE (FADD-like IL-1β-Converting Enzyme)-Inhibitory Protein</i>
clAP	<i>cellular Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
CK-19	Cytokeratin-19
CPEB	<i>Cytoplasmic-Element-Binding</i>
CSV	<i>Comma-separated values</i>
Ct	<i>Cycle treshold</i>
CT	Computertomografie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTNNB1	β -Catenin-Gen
CYLD	Cylindromatosis
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DUB	deubiquitinierendes Enzym
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitinligase
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECOG	<i>Eastern Cooperative of Oncology Group</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain Protein</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	fetales Kälberserum
FLAG-tag	DYKDDDDK-tag
FNH	Fokale Noduläre Hyperplasie
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBC3	<i>Globose Basal Cells</i>

ggf.	gegebenenfalls
GPC-3	Glypican-3
GS	Glutaminsynthetase
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3-Hemmung
h	Stunde
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCA	Hepatozelluläres Adenom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HepPar1	<i>Hepatocyte Paraffin 1</i>
HGDN	<i>high-grade</i> dysplastischer Knoten
4-HNE	4-Hydroxynonenal
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HRP	<i>Horse-Radish-Peroxidase</i>
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
iCCA	intrahepatisches Cholangiokarzinom
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IκB	<i>Inhibitor of Nuclear Factor kappa B</i>
IKK	IκB-Kinase-Komplex <i>Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase Subunit α/β/γ</i>
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
IRAK 1 und 4	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1 und 4
IRS	Immunreaktiver Score
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinase</i>
K	Lysin (s. auch Lys)
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
lncRNA	<i>long noncoding RNA</i>
LG	(nicht-neoplastisches) Lebergewebe
LGDN	<i>low-grade</i> dysplastischer Knoten
LK	Lymphknoten
Lys	Lysin (s. auch K)
M	Mol
MAP3K7	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7</i>
MAP(K/KK/KKK)	<i>Mitogen-Activated Protein (Kinase/ Kinase Kinase /Kinase Kinase Kinase)</i>
max.	maximal
Mdr2	<i>Multi-Drug Resistance Gene 2</i>
min	Minute
mind.	mindestens
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomografie
mTORC1	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1</i>
MW	Mittelwert
MWA	Mikrowellenablation
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NEB	<i>New England BioLabs</i>
NEMO	<i>NF-kappa-B Essential Modulator</i>

NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-cells</i>
NIK	NF- κ B-Induzierende Kinase
NOD1/2	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Protein 1/2</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Factor 2</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
NZF	C-terminale Npl4 Zink Finger Domäne
o.g.	oben genannt
O-GlcNAcylierung	<i>O-linked β-N-Acetylglucosaminylierung</i>
PARP1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PEI	Perkutane Ethanolinjektion Polyethylenimine (PEI-PBS)
PGC-1 α	PPAR- γ Koaktivator-1 alpha
PH3	Phosphohiston H3
PPAR- γ	<i>Peroxisomen Proliferator-Activated Receptor-γ</i>
PP	Proteinphosphatase
pRB	Retinoblastom-Protein
RANKL	Rezeptoraktivierer des NF- κ B-Liganden
RFA	Radiofrequenzablation
RIP1	<i>Receptor-Interacting Protein 1</i>
RT	Raumtemperatur Reverse Transkriptase
RTU	<i>Ready-To-Use</i> Antikörper
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serin
SIRT	selektive intraarterielle Radiotherapie
SKIL	<i>SKI-like Proto-Oncogene</i> , Synonym SnoN
SnoN	Sloan-Kettering Institute (Ski) Novel, Synonym SKIL
Tab.	Tabelle
TAB	TAK1-bindendes Protein
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAK1	TGF- β -aktivierte Kinase 1
TAK1 Δ E12	TAK1 ohne Exon 12
TAK1FL	TAK1 <i>Full Length</i>
TAO	<i>Thousand-And-One Amino Acid Kinase 2</i>
TARE	Transarterielle Radioembolisation
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Thr	Threonin
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TNF	Tumornekrosefaktor- α
TNFR	Tumornekrosefaktor- α -Rezeptor
TNM	<i>Tumor Nodus Metastase</i>
TC	<i>T-Cell</i>
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRIKA 1 and 2	<i>TRAF6-Regulated IKK Activators 1 and 2</i>
TTF1	thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
u.a.	unter anderem
Ubc	Polyubiquitin-C
Ubc13	Ubiquitin-konjugierendes Enzym 13
Uev1a	Ubiquitin Ea Variante 1a

UICC	<i>Union Internationale Contre Le Cancer</i>
USP4	Ubiquitin-spezifische Protease 4
V1	mikrovaskuläre tumoröse Gefäßinvasion
V2	makrovaskuläre tumoröse Gefäßinvasion
v.a.	vor allem
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VETC	<i>Vessels Encapsulating Tumor Clusters</i>
Wnt	<i>Wingless und int-1</i>
z. B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abb. 1.1: Histopathologie des HCCs.....	5
Abb. 1.2: WHO-Grading des HCCs.....	6
Abb. 1.3: Immunhistochemische Marker des HCCs.....	6
Abb. 1.4: Zirrhose-Karzinom-Sequenz.....	11
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Rolle von TAK1 im NF- κ B-Signalweg.....	14
Abb. 1.6: Wege nach TNF- α -Stimulation: Regulation von Überleben, Apoptose, Nekroptose.....	15
Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Isoformen TAK1 Δ E12 und TAK1FL.....	16
Abb. 1.8: Struktur von TAK1.....	17
Abb. 1.9: Mechanismus der Inaktivierung von TAK1.....	18
Abb. 2.1: Beispiel einer H.E.-Färbung des HCC-TMAs.....	32
Abb. 2.2: Das HCC-Kollektiv: Darstellung der Anzahl histopathologischer Proben.....	33
Abb. 2.3: Immunreaktiver Score.....	35
Abb. 2.4: Beispiel für das Layout der HALO-Auswertung.....	37
Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Inserts inklusive der ermittelten Parameter.....	49
Abb. 3.1: Induktion von TAK1 im HCC.....	56
Abb. 3.2: TAK1-Induktion in HCC-Metastasen.....	57
Abb. 3.3: Vergleich der TAK1-Expression zwischen HCC und zugehörigem, nicht- neoplastischem Lebergewebe auf Proteinebene.....	58
Abb. 3.4: Semiquantitative Expressionsanalyse von TAK1FL und TAK1 Δ E12 in humanen HCCs und respektiven Lebergeweben.....	59
Abb. 3.5: Quantitative Real-Time PCR von TAK1 - Exon 2 und Exon 12 - im HCC und nicht-neoplastischen Lebergewebe.....	60
Abb. 3.6: Immunblot von HEK293T- und Huh7-Gesamtzelllysaten zur Kontrolle von Transfektionskonstrukten.....	61
Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopie der TAK1-Überexpressionskonstrukte in Huh7-Zellen....	62
Abb. 3.8: Einfluss von TAK1 auf das Migrationsverhalten von Huh7-Zellen.....	63
Abb. 3.9: Einfluss der TAK1-Expression auf Apoptose und Proliferation im HCC <i>in situ</i>	64
Abb. 3.10: Einfluss von TAK1 auf die Proliferation in HCC-Zellen <i>in vitro</i>	65
Abb. 3.11: Kaplan-Meier-Analyse der TAK1-Expression in HCCs.....	66
Abb. 3.12: Korrelation der TAK1-Expression im HCC mit klinischen Parametern.....	68
Abb. 3.13: TAK1-Expression und pathologische sowie molekulare Parameter.....	70
Abb. 3.14: TAK1-Expression in HCCs in Bezug auf tumoröse Gefäßinvasion, VETC-Muster und intratumorale Gefäßdichte.....	71
Abb. 3.15: TAK1-Expressionsmuster in humaner Leber und im HCC.....	72
Abb. 3.16: Immunfluoreszenzmikroskopie von FLAG in transient TAK1-transfizierten Huh7- Zellen.....	73
Abb. 3.17: Immunblot-Analyse von HEK293T-, Huh7- und HepG2-Zellfraktionen von Zytoplasma und Zellkern.....	74
Abb. 3.18: Immunblotanalyse von HCC- und Lebergewebeproben nach Fraktionierung.....	75
Abb. 3.19: Immunblotanalyse von Gesamtzelllysaten sowie von zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen von Leber- und HCC-Gewebe.....	76
Abb. 3.20: Expressionsanalyse von RELB mittels Immunblot im HCC und zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe.....	77
Abb. 3.21: Expression von TAK1 und RELB in Zellkultur.....	78
Abb. 7.1: Vektorkarten von pcDNA3 und PJET.....	CI
Abb. 7.2: Kaplan-Meier-Analyse der TAK1-Expression in HCCs.....	CIV

Tabellen:

Tab. 1.1: Barcelona-Klassifikation (BCLC)	3
Tab. 1.2: ECOG-Einteilung	3
Tab. 1.3: Child-Pugh-Score.....	3
Tab. 1.4: Aktuelle TNM-Klassifikation und UICC-Stadien des HCCs.....	6
Tab. 1.5: BCLC-Stadien und Behandlung eines HCCs bei Leberzirrhose	8
Tab. 2.1: Geräte und Hersteller.....	21
Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller	22
Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller oder Bezugsquelle	23
Tab. 2.4: Verwendete Kits.....	25
Tab. 2.5: Kit für die immunhistochemische Färbung	25
Tab. 2.6: Größenmarker	25
Tab. 2.7: Puffer	26
Tab. 2.8: Kulturmedien.....	27
Tab. 2.9: Primärantikörper	27
Tab. 2.10: Sekundärantikörper für den Immunblot	28
Tab. 2.11: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie	29
Tab. 2.12: Fluoreszenzfarbstoffe	29
Tab. 2.13: Enzyme.....	29
Tab. 2.14: Primer für die PCR von TAK1	30
Tab. 2.15: Primer für die Sequenzierung nach Sanger.....	30
Tab. 2.16: Primer für die Realtime-PCR.....	30
Tab. 2.17: Primer für die semiquantitative PCR und für die Kolonie-PCR	30
Tab. 2.18: Klinisch-pathologische Daten des HCC-Kollektivs.....	33
Tab. 2.19: Pipettierschema des 2-fach RT Master Mix.....	40
Tab. 2.20: Cyclor Programm	40
Tab. 2.21: Pipettierschema für PCR-Reaktionen in einem 25 µl-Ansatz.....	40
Tab. 2.22: PCR-Protokoll	40
Tab. 2.23: Pipettierschema für den Ligationsansatz pJet-TAK1	42
Tab. 2.24: Ligationsansatz für die Ligation von TAK1 in den Zielvektor	42
Tab. 2.25: Pipettierschema des Restriktionsverdau.....	43
Tab. 2.26: Pipettierschema der Restriktionsverdau-Ansätze.....	43
Tab. 2.27: Ansatz der Kolonie-PCR	44
Tab. 2.28: Protokoll für die Kolonie-PCR.....	44
Tab. 2.29: Pipettierschema des Mastermix	45
Tab. 2.30: Pipettierschema der Primervalidierung mit Verdünnungsreihe	46
Tab. 2.31: Programm der qPCR	46
Tab. 2.32: Ansatz der semiquantitativen PCR.....	47
Tab. 2.33: Protokoll für die semiquantitative PCR	47
Tab. 2.34: Pipettierschema der PEI-Transfektion.....	49
Tab. 2.35: Pipettierschema der Polyacrylamidgele unterschiedlicher Prozentigkeiten.....	52
Tab. 3.1: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse von klinisch-prognostischen Faktoren und TAK1 (Gesamtüberleben).....	67
Tab. 3.2: Klinische Parameter in Bezug auf die TAK1-Expression	69
Tab. 7.1: Klinische und pathologische Daten in Bezug auf die TAK1-Expression.....	CII
Tab. 7.2: Humanes Probenkollektiv für Immunblot und cDNA-Isolierung für qPCR.....	CIII

1 Literaturdiskussion

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC)

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Klinik des HCCs

Das Hepatozelluläre Karzinom stellt den häufigsten primären Lebertumor dar und ist die weltweit sechsthäufigste Krebserkrankung. Aufgrund aktuell noch begrenzter Therapiemöglichkeiten steht das HCC an vierter Stelle krebsbedingter Todesursachen. Männer erkranken etwa dreimal so häufig wie Frauen, besonders hoch ist die Inzidenz in Asien (WHO, 2020).

Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines HCCs ist das Vorliegen einer Leberzirrhose jedweder Ätiologie. Am stärksten begünstigen chronische Virusinfektionen die HCC-Entstehung (EASL, 2018). Vor allem in westlichen Ländern ist auch die alkoholische und nicht-alkoholische Steatohepatitis (ASH, NASH) von zunehmender Relevanz (El-Serag, 2011). Auch Patienten mit Erkrankungen wie der Eisenspeicherkrankheit Hämochromatose oder erblich bedingten Stoffwechselstörungen wie dem alpha-1-Antitrypsinmangel weisen ein erhöhtes HCC-Risiko auf (Villanueva *et al.*, 2010; Antoury *et al.*, 2015).

Bei noch intakter Leberfunktion bleibt das HCC lange unentdeckt (Dimitroulis *et al.*, 2017). Die oft assoziierte Leberzirrhose kann unspezifische Beschwerden wie Leistungsminderung, Konzentrationsschwäche und Müdigkeit verursachen (Kew *et al.*, 1971). In fortgeschrittenen Stadien sind Hepatomegalie, Oberbauchbeschwerden, Ikterus, Fieber, Gewichtsverlust und Aszites typische Symptome einer Dekompensation (Kew *et al.*, 1971). Das HCC selbst kann paraneoplastische Syndrome wie Hypercholesterinämie, Hyperkalzämie, Hypoglykämie und Erythrozytose verursachen (Dimitroulis *et al.*, 2017).

Patienten mit bekannter Leberzirrhose sollten in ein Früherkennungsprogramm eingeschlossen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Dieses beinhaltet eine halbjährliche Ultraschalluntersuchung mit möglicher Sensitivitätserhöhung durch die Bestimmung des Tumormarkers alpha-Fetoprotein (AFP) (Tzartzeva *et al.*, 2018). Bei Diagnosestellung findet man bei ca. 10 % bis 15 % bereits extrahepatische Metastasen, die hauptsächlich in der Lunge, in intraabdominellen Lymphknoten, im Knochen sowie in der Nebenniere lokalisiert sind (Uka *et al.*, 2007).

1.1.2 Diagnostik

1.1.2.1 Klinische Diagnostik

Zur Diagnosestellung des HCCs dient die kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) (Lee *et al.*, 2015). Die Beobachtung einer charakteristischen früharteriellen Hyperperfusion mit anschließendem sogenannten *Wash-out* in der portalvenösen Phase ist für die Diagnose bei Hochrisikopatienten ausreichend, so dass direkt mit der Ausbreitungsdiagnostik fortgefahren werden kann (Khalili *et al.*, 2011). Bei Bedarf können die Kontrastmittel-Sonographie oder -Computertomografie (CT) noch ergänzend angeschlossen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Eine Biopsie ist nur bei uneindeutigem Kontrastmittelverhalten in zwei unabhängigen Bildgebungen, vor Einschluss in klinische Studien sowie in Palliativsituationen mit therapeutischer Konsequenz indiziert (Di Tommaso *et al.*, 2019).

Als Tumormarker wird in der Routinediagnostik AFP im Serum eingesetzt. Er eignet sich nicht für Screening und Diagnostik, ist aber zur Verlaufsbeurteilung und zur Kontrolle des Therapieerfolgs hilfreich (Kobayashi *et al.*, 2011) und hat sich bislang als sensitivster Marker erwiesen (Marrero *et al.*, 2009).

Die aktuell gängigste Einteilung der HCC-Stadien zur Therapieentscheidung ist die *Barcelona Clinic Liver Cancer*-(BCLC-)Klassifikation, in die klinische Faktoren wie der Allgemeinzustand der Tumorpatienten einbezogen werden (Tab. 1.1; Llovet *et al.*, 1999). Erfasst wird dieser durch den sog. ECOG-Status als Index für die Lebensqualität, der von der *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) eingeführt wurde und sechs Kategorien umfasst (Tab. 1.2; Oken *et al.*, 1982). Weiterhin fließen die Parameter Bilirubin, portale Hypertension und Stadium der Leberzirrhose als Zeichen der Leberfunktion mit in die BCLC-Stadien ein. Die Prognose der Leberzirrhose wird anhand der Child-Pugh-Einteilung klassifiziert. Sie beinhaltet die Kriterien Serum-Bilirubin, Serum-Albumin, Quick, Aszites im Ultraschall sowie hepatische Enzephalopathie (Tab. 1.3; Child und Turcotte, 1964; Pugh *et al.*, 1973). Für die BCLC-Klassifikation sind Größe, Zahl, Gefäßinvasion, Lymphknotenmetastasen und Metastasen des HCCs relevant (EASL, 2018).

Die sogenannten Mailand-Kriterien helfen bei der Auswahl der für eine Transplantation in Frage kommenden Patienten. Sie sind erfüllt, sofern ein Tumorherd unter 5 cm oder mehrere bis maximal 3 cm große Tumorherde vorliegen (Mazzaferro *et al.*, 1996). Extrahepatische Metastasen und Blutgefäßinfiltrationen dürfen nicht vorliegen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022).

Tab. 1.1: Barcelona-Klassifikation (BCLC)

Stadium	ECOG (Allgemeinzustand)	Primärtumor	Leberfunktion (CHILD-Score bei Leberzirrhose)
0	0	singulärer Tumor < 2 cm	keine Leberzirrhose oder max. Child A
A1	0	solitärer Primärtumor < 5 cm *	keine portale Hypertension, Bilirubin normal
A2			portale Hypertension, Bilirubin normal
A3			portale Hypertension, Bilirubin erhöht
A4			Child-Pugh A oder B
B (intermediär)	0	multilokulärer Befall, Herde > 3 cm	Child-Pugh A oder B
C (fortgeschritten)	1-2	zusätzliche Gefäßinvasion oder Metastasen	Child-Pugh A oder B
D (Endstadium)	3-4	alle höhergradigen Befunde	Child-Pugh C

* Mailand-Kriterien erfüllt: Ein solitärer Knoten unter 5 cm oder mehrere Tumorknoten mit max. 3 Herden unter 3 cm. Stadium A und B: Alle Kriterien sollten erfüllt sein. Stadium C: Mind. ECOG oder Tumorkriterien zutreffend. Stadium D: Ein Kriterium ist ausreichend (Llovet *et al.*, 1999).

Tab. 1.2: ECOG-Einteilung

ECOG	Beschreibung
0	normale uneingeschränkte Aktivität
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, leichte Arbeit möglich
2	gefähig, selbstversorgend, aber nicht arbeitsfähig
3	Selbstversorgung nur eingeschränkt möglich, über 50 % der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden
4	pflegebedürftig ohne Selbstversorgung, völlig an Stuhl oder Bett gebunden
5	tot

(Oken *et al.*, 1982).

Tab. 1.3: Child-Pugh-Score

Kriterien / Punkte* ¹	1	2	3
Albuminkonzentration im Serum in g/dl	> 3,5	2,8 – 3,5	< 2,8
Bilirubinkonzentration im Serum in mg/dl	< 2,0	2,0 – 3,0	> 3,0
Quick-Wert in %	> 70	40 - 70	< 40
Aszites (sonographisch)	kein	mäßig	viel
Hepatische Enzephalopathie* ²	keine	Grad I-II	> Grad II

*1: Child A: 5 bis 6 Punkte; Child B: 7 bis 9 Punkte; Child C: 10 bis 15 Punkte (Child und Turcotte, 1964)

*2: I: Leichtgradige Minderung der Bewusstseinslage mit zunehmendem Schlafbedürfnis. II: Erhebliche Minderung der Bewusstseinslage mit Orientierungsstörungen. III: Hochgradige Bewusstseinsstörung. IV: Bewusstlosigkeit ohne Reaktion auf Schmerzreize (Vilstrup *et al.*, 2014).

1.1.2.2 Histopathologische Diagnostik

Der Goldstandard in der Diagnostik des HCCs bleibt die Histopathologie (EASL, 2018) mit Beurteilung gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation (Lokuhetty, 2019). Bei der histopathologischen Aufarbeitung werden die Tumorausdehnung, der HCC-Subtyp, der Differenzierungsgrad, der Resektionsrand sowie das umliegende, nicht-tumoröse Lebergewebe beurteilt (Burt *et al.*, 2018).

Makroskopisch stellt sich ein HCC meist als einzelner Knoten oder aus mehreren Knoten bestehender Tumor auf dem Boden einer Leberzirrhose dar. Die Farbe der Knoten ist variabel von grünlich, gelblich zu bräunlich. Oft kommen Einblutungen und Nekrosen vor. Histologisch sind ein Verlust der Portalfelder, eine gestörte oder aufgehobene Retikulinfaserarchitektur sowie eine vermehrte Zelldichte und Arterialisierung charakteristisch. Die Karzinomzellen sind polygonal mit Kernatypien, verschobenem Kern-Zytoplasma-Verhältnis und prominenten Nukleolen (Abb. 1.1 a). Eine Galleproduktion im Tumor kann bei der HCC-Diagnose hilfreich sein, da sie ausschließlich im HCC und nicht bei anderen Tumoren vorkommt (Chen IY, 2021). Das Wachstumsmuster von HCCs kann u.a. trabekulär, pseudoglandulär oder solide sein (Abb. 1.1 b). Weiterhin werden die Subtypen szirrhöse, steatohepatitische, makrotrabekuläre, klarzellige und lymphozytenreiche HCCs unterschieden (Abb. 1.1 c; Calderaro *et al.*, 2017). Das fibrolamelläre hepatozelluläre Karzinom geht nicht mit einer Leberzirrhose einher und hat daher eine bessere Prognose. Es ist von den anderen Subtypen abzugrenzen, ansonsten hat die Einteilung bisher keinen Einfluss auf den Therapieansatz (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022; Chaudhari *et al.*, 2018).

Das HCC muss von intrahepatischen Cholangiokarzinomen (iCCAs), Lebermetastasen, Fokalen Nodulären Hyperplasien (FNHs), Hepatozellulären Adenomen (HCAs) und Vorläuferläsionen des HCCs unterschieden werden. Hierbei können immunhistochemische und molekularpathologische Marker unterstützend herangezogen werden (Raul S. Gonzalez, 2022; Neoplasia, 2009).

Das Staging erfolgt anhand der auf der TNM-Klassifikation beruhenden *Union Internationale Contre Le Cancer*-(UICC-)Klassifikation (Tab. 1.4; Lokuhetty, 2019).

Für das histologische Grading stehen verschiedene Klassifikationen zur Verfügung. Das dreistufige WHO Grading unterscheidet zwischen guter, mittelmäßiger und schlechter Differenzierung (Lokuhetty, 2019). Häufig wird auch das vierstufige Grading nach Edmondson und Steiner verwendet (Abb. 1.2; Edmondson und Steiner, 1954; Chen IY, 2021).

Zur histopathologischen Untersuchung werden routinemäßig mindestens die Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Standardfärbung, *Periodic Acid-Schiff*-(PAS-)Färbung und eine Faserfärbung verwendet (AWMF, 2013). Zusätzlich können immunhistochemische Marker zur Abgrenzung von Metastasen sowie bei unsicherer Malignität zur Diagnoseunterstützung herangezogen werden. Zur histologischen Differenzierung zwischen *high-grade*-Dysplasie und HCC eignen sich die Marker Glypican-3 (GPC-3), Heat-Shock-Protein-70 (HSP-7) und Glutaminsynthetase

(GS) (Abb. 1.3). Positivität von zwei der drei Marker ist mit 70%iger Sensitivität und nahe 100%iger Spezifität diagnostisch für das Vorliegen eines HCCs (Di Tommaso *et al.*, 2009). Molekulargenetische Analysen sind gemäß aktueller Datenlage nicht notwendig (Chen *et al.*, 2021).

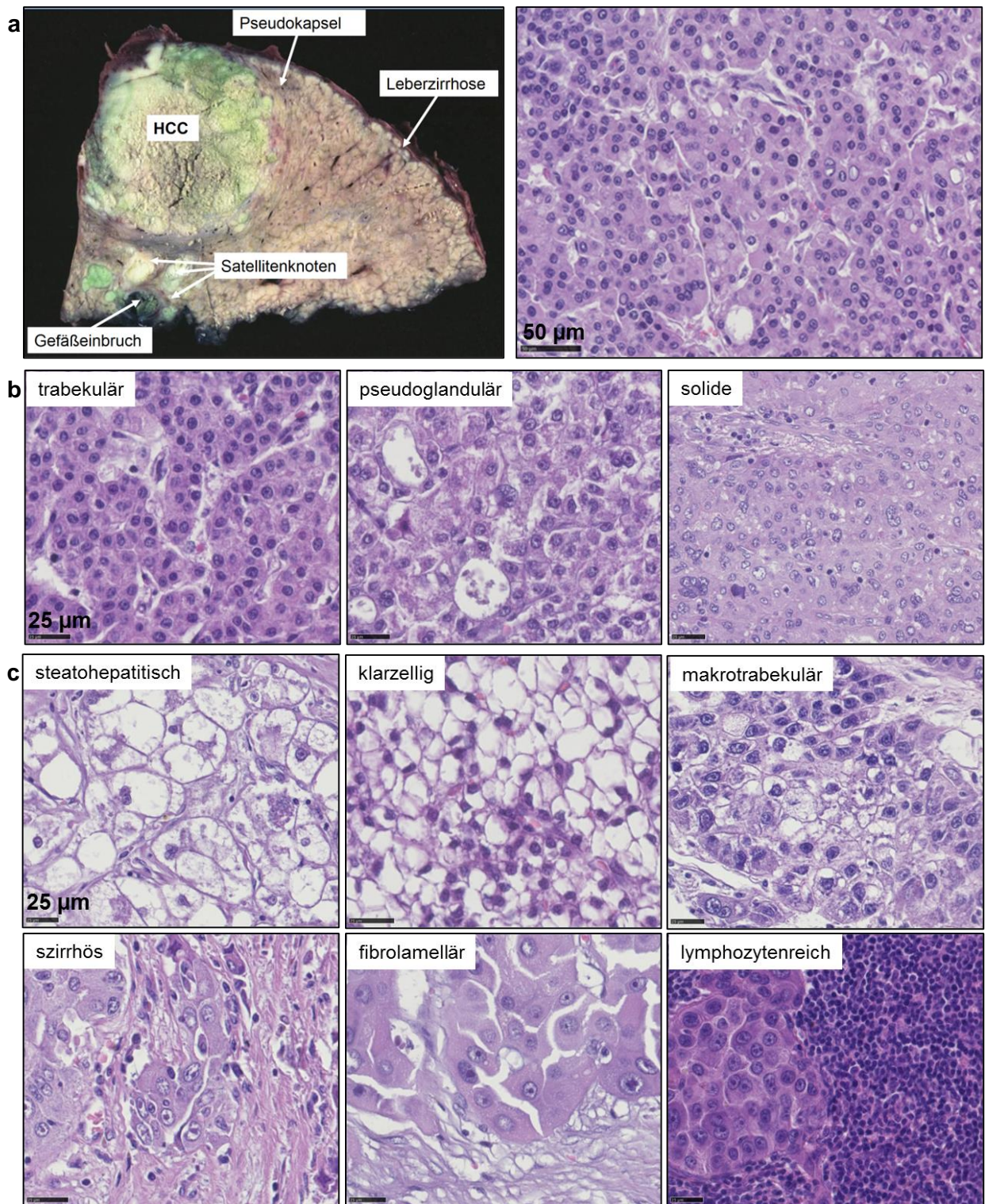


Abb. 1.1: Histopathologie des HCCs. a) Repräsentatives makroskopisches Bild eines HCCs und passende Histologie. b) Verschiedene Wuchsmuster des HCCs. c) Verschiedene Subtypen des HCCs.

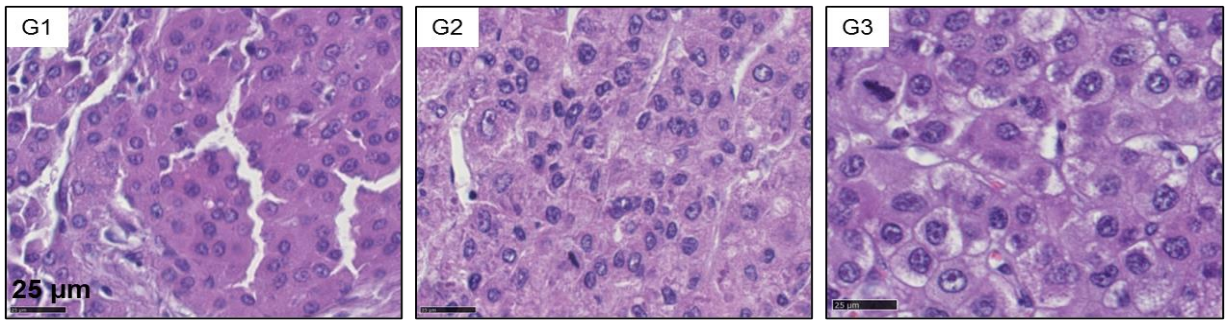


Abb. 1.2: WHO-Grading des HCCs. G1: gut differenziert. G2: mäßig differenziert. G3: schlecht differenziert.

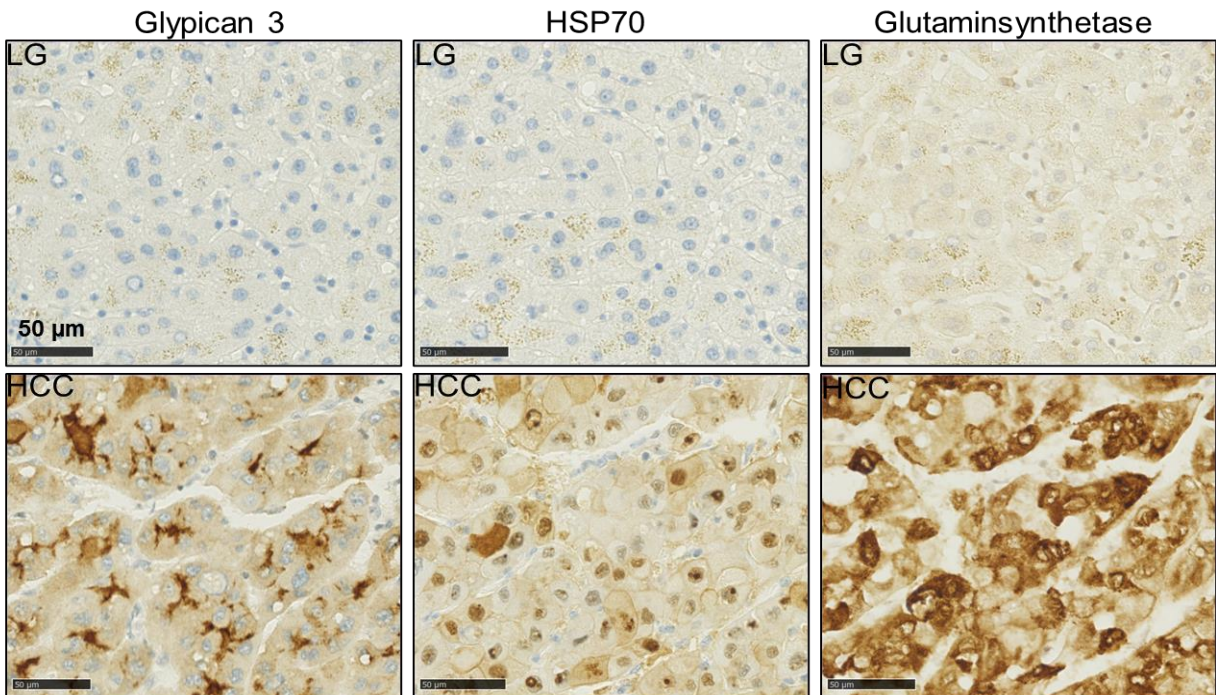


Abb. 1.3: Immunhistochemische Marker des HCCs. In der Routinediagnostik verwendete zusätzliche immunhistochemische Marker am Beispiel einer TMA-Stanze: Positivität der drei Marker Glypican 3, HSP70 und Glutaminsynthetase im HCC. Abk.: HCC = Hepatozelluläres Karzinom, LG = nicht-neoplastisches Lebergewebe.

Tab. 1.4: Aktuelle TNM-Klassifikation und UICC-Stadien des HCCs

TNM	UICC-Stadium	Befund
pT1a	IA	solitärer Tumor ≤ 2 cm +/- Gefäßinvasion
pT1b	IB	solitärer Tumor > 2 cm ohne Gefäßinvasion
pT2	II	solitärer Tumor > 2cm mit Gefäßinvasion oder multiple Tumore ≤ 5 cm
pT3	IIIA	multiple Tumore > 5 cm
pT4	IIIB	Tumore mit Beteiligung größerer Äste der Portalvene oder Lebervene, direkte Invasion von Nachbarorganen (inkl. Zwerchfell, ohne Gallenblase), Serosaperforation
pN0	-	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	IVA	Metastasen in regionären Lymphknoten
M0	-	keine Fernmetastasen
M1	IVB	Fernmetastasen

(Lokuhetty, 2019)

1.1.3 Therapie

Bei der Auswahl der Therapie spielt das BCLC-Stadium die wichtigste Rolle (Tab. 1.5). Da mehrere Therapieoptionen zur Verfügung stehen, sollten HCC-Patienten in interdisziplinären Tumorboards besprochen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Zu den kurativen Therapieoptionen zählen die chirurgische Resektion und die Lebertransplantation. Auch die ablativen Verfahren Radiofrequenzablation (RFA) und Mikrowellenablation (MWA) können in kurativer Intention durchgeführt werden. Hierbei wird über gepulst abgegebenen Hochfrequenzstrom eine Hitzenekrose des Tumorgewebes erzeugt (Higgins und Berger, 2006; Krebsgesellschaft, 2021). Palliativ können transarterielle Verfahren wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder die selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT) zum Einsatz kommen. Bei der TACE werden intraarteriell Chemotherapeutika und anschließend embolisierende Partikel in die tumorversorgende Arterie eingebracht. Im Rahmen der Brachytherapie SIRT, auch als transarterielle Radioembolisation (TARE) bezeichnet, wird radioaktives Material intraarteriell eingebracht. So soll eine ischämische Tumornekrose erzeugt werden. Die Verfahren eignen sich besonders bei lokal fortgeschrittenen Stadien (Yang *et al.*, 2019). Weiterhin sind eine palliative Systemtherapie oder eine rein symptomorientierte Behandlung („*Best supportive Care*“) in Betracht zu ziehen (Kirstein und Wirth, 2020; Stuart, 2022).

In nicht-zirrhotischer Leber ist in den frühen Stadien therapeutisch nach Möglichkeit eine Resektion anzustreben (Zhou *et al.*, 2014). Falls keine Resektion möglich ist, kann alternativ eine RFA durchgeführt werden (EASL, 2018). Ist die Anwendung kurativer Verfahren nicht möglich, kann eine TACE angeboten werden (Yang *et al.*, 2019). Bei Vorliegen einer Leberzirrhose können Resektionen durchgeführt werden, sofern die restliche Leberfunktion dies zulässt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Sind die Mailand-Kriterien erfüllt, ist eine Transplantation die Therapie der Wahl (EASL, 2018). Ansonsten kann versucht werden, die Voraussetzungen durch Vorbehandlung mit anderen Therapien als *Downstaging* zu erreichen (Parikh *et al.*, 2015). Metastasen und makrovaskuläre Gefäßinfiltration als Kontraindikationen müssen ausgeschlossen werden, da diese Faktoren mit hohen Rezidivraten assoziiert sind (Dasari *et al.*, 2020).

In Stadium B kommt als Erstlinientherapie die TACE in Betracht, die gegebenenfalls mehrfach durchgeführt werden muss (EASL, 2018). Alternativ ist auch eine SIRT mit gleichwertigen Ergebnissen möglich (Kolligs *et al.*, 2015). In Stadium C kann ein systemischer Therapieversuch unternommen werden. Lange galt der Multikinaseinhibitor Sorafenib als Medikament der Wahl (Hollebecque *et al.*, 2011; AWMF, 2013). Er hemmt die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (VEGFR) 1, 2 und 3, den Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor-Rezeptor- β (PDGFR- β) und Kinasen der Raf-Familie (Yang *et al.*, 2019). Allerdings sind Nutzen und Ansprechrate dieser Therapie relativ gering (Llovet *et al.*, 2008), sie führt lediglich zu einer Lebensverlängerung von im Mittel zwei bis drei Monaten (Yang *et*

al., 2019). Inzwischen sind weitere, noch in Phase-III befindliche Substanzen hinzugekommen: Als Erstlinientherapie zeigte sich eine Überlegenheit der Kombination des *Programmed Death-1-Ligand*-(PD-L1-)Antikörpers Atezolizumab und des *Vascular Endothelial Growth Factor*-(VEGF-)Hemmers Bevacizumab gegenüber Sorafenib (Finn *et al.*, 2020). Atezolizumab ist ein T-Zell-regulierender *Checkpoint*-Inhibitor. Tumorzellen versuchen eine Immunantwort gegen sich selbst zu umgehen, indem sie Moleküle exprimieren, die eine überschießende Immunantwort verhindern. Atezolizumab bindet an von Tumorzellen exprimiertes PD-L1, um deren Interaktion mit PD-1 auf tumorinfiltrierenden T-Zellen zu verhindern. So wird die antitumoröse T-Zellantwort nicht mehr unterdrückt, das Immunsystem kann auf die Tumorzellen reagieren. Es wird eine synergistische Wirkweise mit den antiangiogenetischen VEGF-Hemmern angenommen (Zander H, 2020). Auch der Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib ist Sorafenib gleichwertig und gilt ebenfalls als Mittel der Wahl (Kudo *et al.*, 2018). Darüber hinaus haben sich bei Progress unter Sorafenib die Gabe der Tyrosinkinasehemmer Regorafenib oder Cabozantinib oder der VEGFR-R2-Rezeptor-Hemmer Ramucirumab im Anschluss als wirksam erwiesen (Bruix *et al.*, 2017; Abou-Alfa *et al.*, 2018). In Stadium D ist eine symptomorientierte Therapie zur Leidminderung angezeigt (EASL, 2018).

Tab. 1.5: BCLC-Stadien und Behandlung eines HCCs bei Leberzirrhose

BCLC-Stadium	Therapie
0	Ablation (RFA) oder Resektion
A	Resektion, Transplantation oder Ablation (PEI/RFA)
B	Chemoembolisation (z.B. TACE)
C	Systemtherapie
D	„Best supportive Care“

1.1.4 Prognose

Die Gesamtüberlebensrate von HCC-Patienten ist in den einzelnen Ländern sehr unterschiedlich: In Taiwan und Japan mit einem intensiven Überwachungsprogramm für Risikopatienten werden 70 % der HCCs bereits in frühen Stadien entdeckt und entsprechend kurativ behandelt (Kudo, 2018). Die Prognose in Korea, China, Nordamerika und Europa ist dagegen schlechter, da sich bei Diagnosestellung über 60 % der HCCs bereits in mittelgradig bis stark fortgeschrittenen Stadien befinden (Park *et al.*, 2015).

Das mediane Überleben beträgt in den BCLC-Stadien 0 und A über 5 Jahre, in Stadium B unter 2,5 Jahre, in Stadium C unter 10 Monaten und in Stadium D nur 3 Monate. Dabei hängt die Prognose stark vom Diagnosezeitpunkt und der Ausprägung einer Leberzirrhose ab (EASL, 2018). Vor allem in mittleren und fortgeschrittenen Stadien ist die Prognose nur unzuverlässig bestimmbar (Yang *et al.*, 2019).

Anders als in den meisten anderen Tumorentitäten nimmt die TNM-Klassifikation bezüglich der prognostischen Einschätzung einen nachrangigen Stellenwert ein (Llovet *et al.*, 1998). Zur

individuellen Prognoseabschätzung werden daher weitere Parameter hinzugezogen: Ein stark erhöhtes AFP im Serum ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Mínguez und Lachenmayer, 2011), so dass sich der Marker in der Klinik etabliert hat. Die Höhe und Anstiegsgeschwindigkeit von AFP im Serum beeinflussen auch die Transplantationsentscheidung, da hohe AFP-Werte trotz Erfüllung der Mailand-Kriterien oft mit Gefäßinvasion assoziiert sind und mit einer sehr hohen postoperativen Rezidivrate einhergehen (Hameed *et al.*, 2014). Auch für VEGF sowie Angiopoietin 2 (Ang2) wurde eine unabhängige prognostische Aussagekraft beschrieben (Llovet *et al.*, 2012). Molekulare Marker werden bislang in die Therapieentscheidung nicht einbezogen und spielen in den aktuellen Leitlinien keine bedeutsame Rolle (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022). Zu etablierten histoprognostischen Faktoren zählen die Tumordifferenzierung und vor allem die Gefäßinvasion (Rastogi, 2018). Da das HCC eine sehr heterogene Entität ist, variiert die Prognose aber auch innerhalb eines Tumorstadiums stark. Auch wenn sich bereits diagnostische Marker etabliert haben, fehlt es an prognostischen Markern (Bai *et al.*, 2020). Lediglich die Cytokeratin (CK) 19-Positivität ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Durnez *et al.*, 2006) und von der WHO als Option zur Prognoseabschätzung anerkannt (Lokuhetty, 2019).

1.1.5 Pathogenese

Chronisch virale Hepatitiden, alkoholische und nicht-alkoholische Steatohepatitis, Verzehr Aflatoxin-kontaminierter Nahrungsmittel oder genetische Erkrankungen führen zu einer chronischen Entzündung der Leber (Dhanasekaran *et al.*, 2016).

Die Entzündungszellen produzieren inflammatorische Substanzen und verursachen Leberzellschädigungen. Dadurch werden sog. *Ito*-Zellen (*stellate cells*) der Leber aktiviert (Farazi und DePinho, 2006): Diese befinden sich im perisinusoidalen Raum und sind unter normalen Bedingungen in einem Ruhestatus. Als Folge bestimmter Stimuli wie beispielsweise TGF- β verändert sich die Genexpression und die übermäßige Produktion von Komponenten der Extrazellulärmatrix wie von Kollagen wird stimuliert. Ein Anhalten dieses Zustandes führt zu Leberfibrose (Barry *et al.*, 2020). Wenn es zusätzlich zu einem Verlust der normalen Läppchen- und Gefäßarchitektur kommt, ist die Zirrhose als Endstadium chronischer Lebererkrankungen erreicht (Blank, 2014). Die Leberzirrhose ist eine fakultative Präkanzerose (Tannapfel, 2020). Auf dem Boden einer Leberzirrhose können sich zunächst weniger als 1 mm große dysplastische Foci entwickeln (Dhanasekaran *et al.*, 2016), welche zu dysplastischen Knoten heranwachsen können. Dysplastische Knoten sind definiert als mind. 1 mm große Läsionen mit heptatozellulären Dysplasien, aber ohne komplette Malignitätskriterien (Party, 1995). Anhand morphologischer Kriterien wird zwischen *low-grade* und *high-grade* dysplastischen Knoten (LGDNs, HGDNs) unterschieden (Nault *et al.*, 2014; Dhanasekaran *et al.*, 2016). Insbesondere die HGDNs haben ein Entartungspotential zum

HCC, bei dem dann bereits eine Stromainvasion als ausschlaggebendes Kriterium vorliegt (Dhanasekaran *et al.*, 2016).

Das frühe HCC ist kleiner als 2 cm und definitionsgemäß gut differenziert (Neoplasia, 2009), wohingegen das fortgeschrittene HCC eine Größe von über 2 cm oder bei einer Größe von unter 2 cm eine schlechte Differenzierung aufweist, oft ist es schon metastasiert (Dhanasekaran *et al.*, 2016).

Auf molekularer Ebene tragen Mutationen zur HCC-Entstehung bei: Zu den häufigsten und frühesten, bereits in prämaligen Läsionen vorhandenen Mutationen gehört die Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) Promotormutation (Nault *et al.*, 2014). TERT ist die katalytische Untereinheit der Telomerase (In der Stroth *et al.*, 2020), die die Chromosomenendstücke wiederherstellt (Dhanasekaran *et al.*, 2016). Bei chronischer Leberschädigung mit hohem Zellumsatz ist die Telomerverkürzung beschleunigt. Apoptose wird eingeleitet und die Regenerationsfähigkeit erlischt (Dhanasekaran *et al.*, 2016). Aufgrund der kurzen Telomere entsteht weiterhin eine chromosomale Instabilität (Farazi und DePinho, 2006). Bei maligner Entartung kommt es zusätzlich zum Verlust des Tumorsuppressorproteins p53 und die Telomerase kann reaktiviert werden. Die genomisch instabilen Zellen können sich nun ungehemmt teilen (Farazi und DePinho, 2006). Eine besondere Stellung nimmt dabei das Hepatitis B Virus ein, das durch Integration ins Wirtsgenom Deletionen und Translokationen verursachen und die chromosomale Instabilität verstärken kann (Dhanasekaran *et al.*, 2016). Auch kann das Virus zu einer Reaktivierung der Telomerase beitragen (Farazi und DePinho, 2006). Außerdem sind Mutationen von CTNNB1, das für das Protoonkogen des *Wingless und int-1*-(Wnt-)Signalweges β -Catenin codiert, bedeutsam (Yang *et al.*, 2019).

Darüber hinaus sind epigenetische Veränderungen von Genregionen wie veränderte DNA-Methylierungen beschrieben, was insbesondere durch Hepatitis C Virus-(HCV-)Infektionen gefördert wird (Lim *et al.*, 2012). Auch Histonmodifikationen, Veränderungen in der Mikro-RNA- und in der *long noncoding* RNA-Expression und im Proteinabbau durch Veränderungen im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg kommen vor (Dhanasekaran *et al.*, 2016).

Durch proinflammatorische Moleküle wird weiterhin der Übergang von der *gap*-(G-)1 in die Synthese-(S-)Phase in den sonst ruhenden Hepatozyten veranlasst (Broelsch, 2003) und es werden tumorfördernde Signalwege wie der im Folgenden näher beleuchtete *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells*-(NF- κ B-)Signalweg aktiviert. So können die dysplastischen Knoten zum HCC entarten (Abb. 1.4; Farazi und DePinho, 2006).

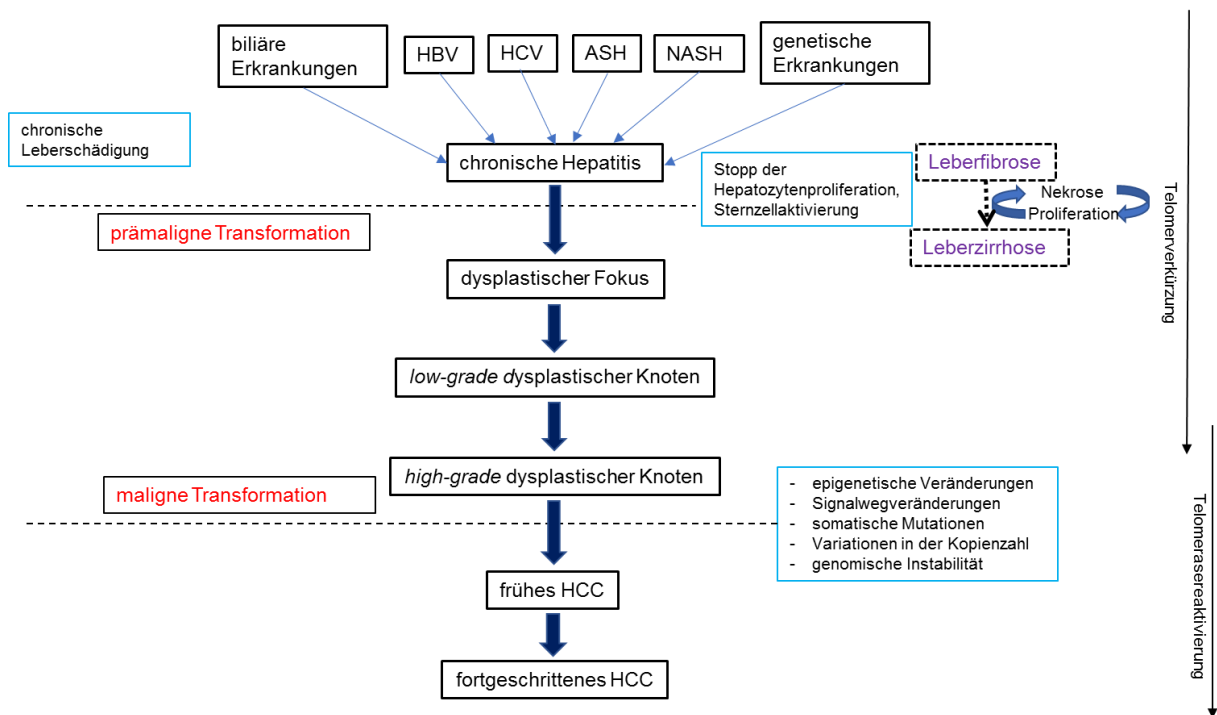


Abb. 1.4: Zirrhose-Karzinom-Sequenz. Verschiedene Noxen verursachen Leberzellschädigungen. Es kommt zu einem Kreislauf aus Nekrose mit kompensatorischer Hepatozytenproliferation und vermehrter Fibrose. Dies kann später in eine Zirrhose übergehen. Dysplastische Foci sowie die in *low- und high-grade* eingeteilten dysplastischen Knoten zählen zu den präkanzerösen Läsionen. Sie können unter anderem durch genomische Instabilität und Tumorsuppressorverlust zum HCC fortschreiten, welches wiederum in frühes und fortgeschrittenes HCC eingeteilt werden kann. Abb. modifiziert nach Farazi und DePinho, 2006 sowie Dhanasekaran *et al.*, 2016.

1.2 Einordnung von TAK1 in den NF- κ B-Signalweg

Eine abnorme Regulation von Signalwegen ist ein wichtiger Bestandteil in der Karzinogenese (Xia *et al.*, 2018). Die TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) ist an verschiedenen Signalwegen beteiligt. Sie wird auch als *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7* (MAP3K7) bezeichnet, was auf die Beteiligung an MAP-Kinase-Signalwegen hinweist, welche aus Phosphorylierungskaskaden bestehen: Auf bestimmte Stimuli hin werden unterschiedliche MAP-Kinase-Kinase-Kinasen phosphoryliert, welche wiederum distinkte MAP-Kinase-Kinasen und diese dann MAP-Kinasen phosphorylieren. Diese Signalwege sind unter anderem bei Umweltstress wie Hitzeschock, ionisierender Strahlung oder Sauerstoffradikalen von Bedeutung (GeneCards, 2021; Kyriakis und Avruch, 2012).

TAK1 ist außerdem ein wichtiger Aktivator des proinflammatorischen und antiapoptischen Transkriptionsfaktor-Komplexes NF- κ B und spielt damit eine entscheidende Rolle im NF- κ B-Signalweg (Pikarsky *et al.*, 2004). Dem NF- κ B-Signalweg wird eine relevante Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben, indem er die Genexpression für Entzündung, Zellproliferation, Überleben, EMT, Invasion, Angiogenese und Metastasierung stimuliert (Taniguchi und Karin, 2018).

1.2.1 Der NF- κ B-Signalweg

1.2.1.1 Klassischer NF- κ B-Signalweg

Bei der Aktivierung von NF- κ B unterscheidet man den schnellen, klassischen-kanonischen Signalweg vom langsamen, alternativen, nicht-kanonischen Weg (Abb. 1.5).

Der klassische Signalweg wird durch extrazelluläre Bindung von Liganden an Zelloberflächenrezeptoren eingeleitet (1). Als erstes wurde die Aktivierung von TAK1 durch *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) über den zugehörigen Rezeptor entdeckt und das Protein nach diesem benannt (Yamaguchi *et al.*, 1995). Zu weiteren aktivierenden Liganden gehören inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und *Tumor Necrosis Factor α* (TNF α) sowie *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) bzw. *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), Toll-like-(TL-), T-Zellen und B-Zellen, die jeweils an die passenden Rezeptoren binden (Pikarsky *et al.*, 2004). Darüber hinaus können auch osmotischer Stress (Inagaki *et al.*, 2008) sowie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und virale Nukleinsäuren aktivierend wirken. Intrazellulär kann über die *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing Proteins* (NOD) 1 und 2 eine Aktivierung herbeigeführt werden (Chiu *et al.*, 2009). Auch Hypoxie sowie der Wnt-Signalweg aktivieren TAK1 (Hirata *et al.*, 2017).

Daraufhin werden an der zytoplasmatischen Rezeptorseite Moleküle rekrutiert: Intrazellulär katalysiert der als Ubiquitin-Ligase fungierende *TNF Receptor Associated Factor* (TRAF) 6 unter Anwesenheit des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) Ubc13 die Produktion einer K63-Polyubiquitinkette (2). Die Kette dient der TAK1-Aktivierung sowie der I κ B-Kinase-Komplex-Rekrutierung. Auch durch Chemo- oder Radiotherapie verursachte DNA-Schäden können die TAK1-Signalwegaktivierung initiieren. Die Ataxia-Teleangiektasia-mutierte Kinase (ATM) veranlasst die ATM-NEMO-Ubc13-Komplexbildung und aktiviert TAK1 (Roh *et al.*, 2014).

TAK1 bindet jeweils C-terminal über die Adapterproteine TAB 2/3 nicht direkt an die von TRAF produzierte Polyubiquitinkette (3) (Lee *et al.*). Für die volle Funktionstüchtigkeit von TAK1 und TABs sind posttranslationale Modifikationen bedeutsam: Dafür bindet TAB1 konstitutiv an die N-terminale Kinasedomäne von TAK1 und induziert dessen Autophosphorylierung (4) (Kishimoto *et al.*, 2000). Das phosphorylierte TAK1 aktiviert besonders nach osmotischem Stress die *c-Jun NH2-terminale Kinase* (JNK). Sie gehört zu den MAPKs und aktiviert wiederum den apoptosefördernden *Activator Protein 1*-(AP-1-)Komplex (5) (Maeda, 2010). Weiterhin wird durch I κ Bs inaktiv im Zytoplasma gehaltenes NF- κ B aktiviert. Dafür wird der *Inhibitor of Nuclear Factor kappa B-Kinase-Komplex* (IKK(I κ B-Kinase)) durch TAK1 aktiviert (6): Er besteht aus den drei Einheiten IKK α , β und γ . Letztere auch als *NF- κ B Essential Modulator* (NEMO) bekannte regulatorische Einheit erkennt K63-Polyubiquitinketten und rekrutiert so den IKK-Komplex und TAK1 (Chiu *et al.*, 2009). Die beiden katalytischen

Untereinheiten IKK α und β bilden IKK α/β -Heterodimere (Roh *et al.*, 2014), die zur Aktivierung des klassischen Wegs benötigt werden (Taniguchi und Karin, 2018).

Der aktive I κ B-Kinase-Komplex phosphoryliert I κ B als Markierung zur Polyubiquitinierung mit darauffolgendem Abbau (Chiu *et al.*, 2009). Es resultiert die Freisetzung des Transkriptionsfaktorkomplexes NF- κ B (7). NF- κ B besteht aus den folgenden fünf Untereinheiten: RELA (=p65), RELB, REL (=c-REL) sowie NF- κ B1 (=p105) und NF- κ B2 (=p100) mit deren aktiven Formen p50 bzw. p52 (8) (Perkins, 2012). Allen gemeinsam ist die N-terminale REL-homologe Domäne (RHD), die für die Translokation in den Zellkern und die Interaktion mit den inhibitorischen Proteinen I κ Bs relevant ist. Die Prozessierung zu den aktiven Formen wird über Polyubiquitinierung gesteuert: Der C-terminale Teil wird über das Proteasom abgebaut, während das N-terminale Ende intakt bleibt (Chiu *et al.*, 2009).

Nach der Freisetzung translozieren die nun aktiven Moleküle p50 und p65 zur Aktivierung von Zielgenen in den Zellkern (9) (Taniguchi und Karin, 2018). Es werden Gene für proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6, Wachstumsfaktoren, Chemokine, Matrix Metalloproteinasen (MMPs), proliferative Proteine wie Cyclin D und MYC, antiapoptotische Proteine wie *B-Cell Lymphoma* (BCL) und *FLICE-like Inhibitory Protein* (FLIP), angiogenetische Faktoren wie VEGF und Adhäsionsmoleküle wie *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) 1 aktiviert. Dadurch werden Entzündung, Zellproliferation, Überleben, EMT, Invasion, Angiogenese und Metastasierung gefördert (Taniguchi und Karin, 2018). Gleichzeitig wird auch ein negativer Feedback-Mechanismus induziert (10) (Kap. 1.2.2.3).

1.2.1.2 Alternativer NF- κ B-Signalweg

Für die Aktivierung des alternativen Weges sorgen zum Beispiel Lymphotoxin B, der Rezeptoraktivator des NF- κ B-Liganden (RANKL), *Cluster-of-Differentiation-Ligand* (CD40L) oder der B-Zell-aktivierende Faktor der TNF-Familie (BAFF) (11). Die Geschwindigkeit des alternativen Wegs hängt von der Neusynthese der NF- κ B-induzierenden Kinase (NIK) ab (Taniguchi und Karin, 2018). NIK wird üblicherweise durch den TNFR-assoziierten Faktor 3 (TRAF3) Ubiquitin-abhängig abgebaut. Bei entsprechenden Stimuli erfolgt der Abbau von TRAF3 durch die E3-Ubiquitinligase *Cellular Inhibitor of Apoptosis* (cIAP), wodurch die NIK-Konzentration erhöht wird (12) (Yu *et al.*, 2020). Die darauffolgende Aktivierung von IKK- α -Homodimeren führt zur Bildung von p52-RelB-Heterodimeren (13), in deren Folge Gene zur Aufrechterhaltung sekundär lymphatischer Organe aktiviert werden (14) (Abb. 1.5; Taniguchi und Karin, 2018).

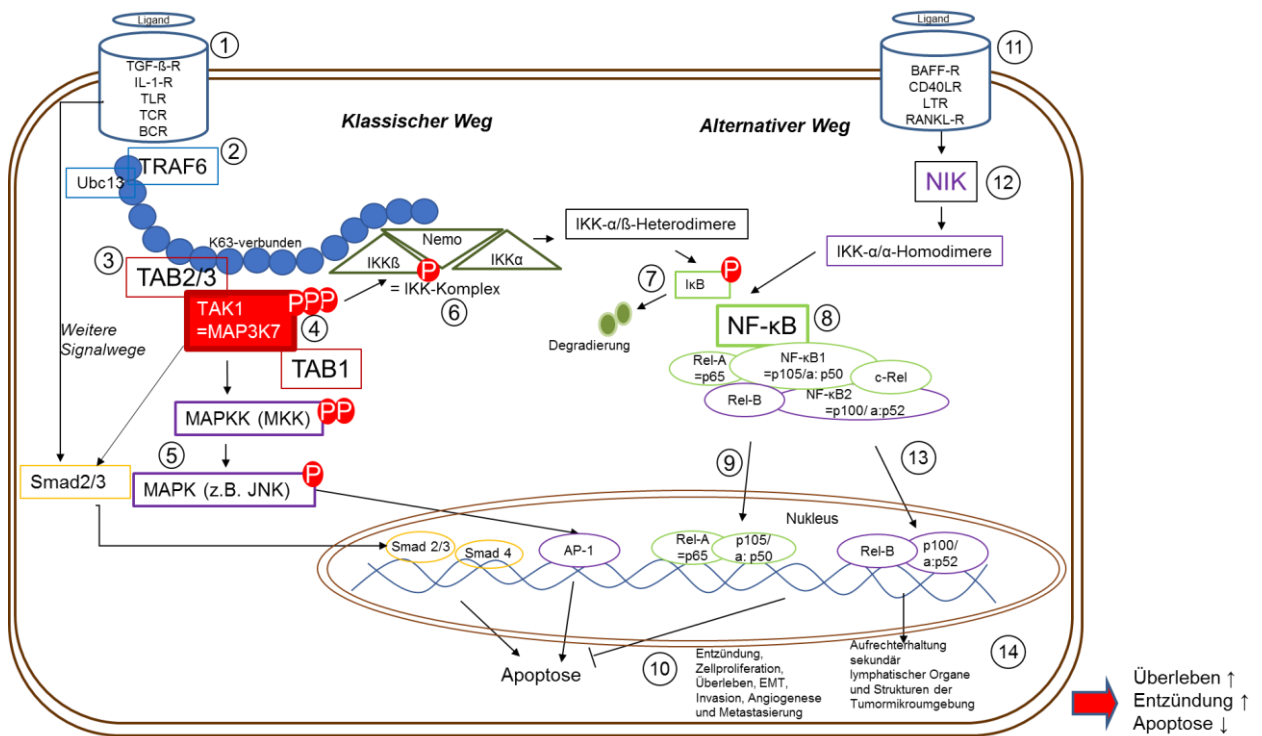


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Rolle von TAK1 im NF-κB-Signalweg. Vereinfachter klassischer TAK1/NF-κB-Signalweg: Nach Ligandenbindung und zytosolischer Komplexbildung wird TAK1 rekrutiert. IKKα/β-Heterodimere werden gebildet und NF-κB wird freigesetzt (Taniguchi und Karin, 2018). Alternativer Weg: NIK induziert die Bildung von IKKα-Homodimeren, welche NF-κB freisetzen (Roh *et al.*, 2014).

1.2.1.3 TNFα-Rezeptor: Regulation des Zellschicksals

Eine besondere Stellung nimmt die Stimulation durch den Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) über den TNF-α-Rezeptor-1 (TNFR1) ein (1), über den Zellüberleben, Apoptose und Nekroptose, eine geregelte Form der Nekrose, reguliert werden. Der Ablauf unterscheidet sich vom oben beschriebenen Ablauf (Mihaly *et al.*, 2014), indem das Adapterprotein *TNFR1-Associated Death Domain* (TRADD) rekrutiert wird. Die Ubiquitinligasen TRAF2/5 bewirken mit Hilfe der E3-Ubiquitinligase cIAP 1/2 und der Proteinkinase *Receptor-Interacting Protein 1* (RIP1) die Polyubiquitinierung und TAK1-Rekrutierung (2). Darüber hinaus dissoziiert der Komplex aus TRADD, TRAF2 und RIP1 vom Rezeptor und bildet einen neuen Komplex mit dem *Fas-Associated Death Domain Protein* FADD und Procaspase 8 (3) (Lee *et al.*). So kann unter bestimmten Umständen neben dem antiapoptotisch wirksamen NF-κB-Weg auch eine Apoptose-Kaskade eingeleitet werden (4) (Chiu *et al.*, 2009). Wenn dieser Weg wiederum durch proinflammatorische Substanzen gehemmt wird, wird Nekroptose induziert (5) (Mihaly *et al.*, 2014). Außerdem reguliert NF-κB wiederum antiapoptotische Proteine wie cFLIP und cIAP hoch, die Caspase 8 hemmen (6). TAK1 hemmt auch die ROS-Akkumulation und damit die Caspase-Aktivierung (7) (Abb. 1.6; Mihaly *et al.*, 2014).

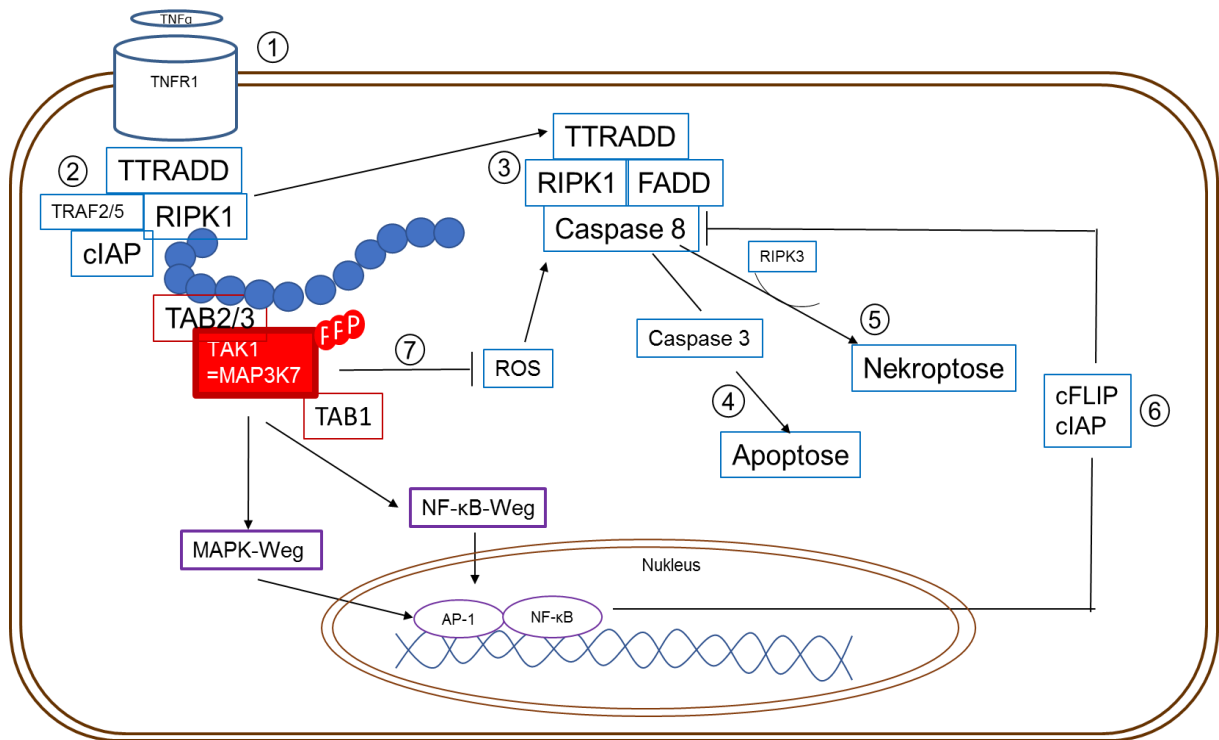


Abb. 1.6: Wege nach TNF- α -Stimulation: Regulation von Überleben, Apoptose, Nekroptose. Nach TNF- α -Stimulation wird eine Polyubiquitinkette akquiriert, an die TAK1 bindet. Der NF- κ B- und MAPK-Weg werden eingeleitet. Alternativ kommt es zur Komplexdissoziation vom Rezeptor mit Einleitung der zur Apoptose führenden Caspase-Kaskade. Bei Hemmung von Caspase 8 wird stattdessen die Nekroptose mittels RIPK1-RIPK3 eingeleitet. Die antiapoptotische Rolle von TAK1 besteht dabei in der Aktivierung von NF- κ B, welches antiapoptotische Proteine aktiviert sowie in der Hemmung der ROS-Akkumulation. Beide Mechanismen hemmen die Einleitung der Caspase-Kaskade (Mihaly *et al.*, 2014).

1.2.2 Struktur von TAK1

1.2.2.1 Isoformen

TAK1 besteht aus 16 Introns und 17 Exons, wobei Exon 12 und 16 als variable Exons am C-terminalen Ende durch alternatives Spleißen variabel sind. Somit sind vier Isoformen, nämlich solche ohne Exon 12 (TAK1 Δ E12), ohne Exon 16 (TAK1 Δ E16), ohne Exon 12 und 16 (TAK1 Δ E12+16) und mit Exon 12 und 16 (TAK1FL) bekannt. Die bedeutendsten und bislang meist untersuchten Formen sind TAK1 Δ E12 mit 579 Aminosäuren (AS) (Variante A, 64 kDa) und TAK1FL (*Full Length*) mit 606 AS (Variante B, 67 kDa) (Abb. 1.7).

Die Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Funktionen, was zu den unterschiedlichen Wirkungen von TAK1 sowohl als Zellüberlebens- als auch Apoptoseförderer beitragen könnte (Tripathi *et al.*, 2019): Das konstitutiv aktive TAK1 Δ E12 übt über Aktivierung von MAPK und NF- κ B eine zellüberlebensfördernde Funktion aus und führt u.a. zur EMT (Tripathi *et al.*, 2019): Hierbei lösen sich die Zellen aus dem Zellverband heraus (Thiery und Sleeman, 2006) und nehmen invasive Eigenschaften an (Lamouille *et al.*, 2014). Der TGF- β -Signalweg spielt hierbei eine wichtige Rolle (Giannelli *et al.*, 2016).

In Metastasen wurde v.a. eine Expression der kurzen Isoform TAK1 Δ E12 berichtet, einige Krebsformen exprimieren auch beide Isoformen. TAK1FL kann nach Stimulation mit TGF- β

Apoptose durch Caspase 3-Spaltung induzieren. Sie ist anders als die kurze Form nicht konstitutiv aktiv (Tripathi *et al.*, 2019). TAK1 wird ubiquitär exprimiert, in verschiedenen Geweben kommen die Varianten aber in unterschiedlicher Häufigkeit vor, so kommt in der Leber besonders häufig TAK1 Δ E12 (Variante A) vor (Tang, 2009).

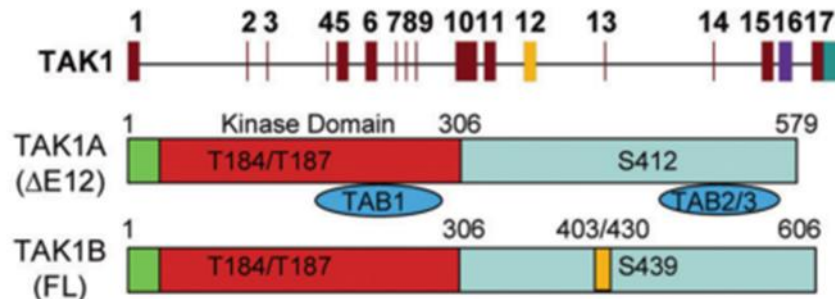


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Isoformen TAK1 Δ E12 und TAK1FL. Oben ist das 17 Exons enthaltende Gen dargestellt, mittig das alternativ gespleißte mRNA-Transkript nach Herausschneiden von Exon 12 (TAK1 Δ E12) und darunter TAK1 mit allen Exons in voller Länge (TAK1FL). Aus Tripathi *et al.*, 2019.

1.2.2.2 Struktur und Aktivierung von TAK1

Die Serin-/Threonin-Kinase TAK1 wird durch das 73 bp große *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7*-(Map3k7-)Gen auf Chromosom 6q15 kodiert (GeneCards, 2021). TAK1 ist aus einem Carboxy-(C-) und Amino-(N-)terminalen Anteil sowie einer mittig gelegenen Scharnierregion zusammengesetzt. Der größere C-Terminus enthält hauptsächlich α -Helices, hier erfolgt die Substratbindung. Der kleinere N-terminale Teil besteht aus fünf antiparallelen β -Faltblatt-Strängen und einer α -Helix zwischen β 3 und β 4 (Abb. 1.8 a).

N-terminal bindet das *TAK1-Binding Protein 1* (TAB1) konstitutiv mit seinen drei Aktivierungsdomänen an die Kinasedomäne. Es sorgt durch Induktion der Autophosphorylierung von TAK1 für die volle Aktivierung der Kinaseaktivität (Aashaq *et al.*, 2019; Brown *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2000). TAB 2 und 3 binden dagegen C-terminal und spielen in der Aktivierung eine vergleichsweise nachrangige Rolle (Aashaq *et al.*, 2019). Adenosin bindet an die katalytische Domäne bestehend aus der Scharnierregion und einer Glycinreichen Region (Brown *et al.*, 2005).

Je nach Stimulus erfolgt die TAK1-Aktivierung unterschiedlich schnell (Dai *et al.*, 2012) und die Kinaseaktivität von TAK1 wird durch posttranslationale Modifikationen gesteuert: Zur Aktivierung der Kinaseaktivität wird Serin-(Ser-)192 nach TAB1-Stimulation autophosphoryliert, daraufhin folgen Threonin-(Thr-)178, Thr-187 und zuletzt Thr-184. Bedeutsam für die Aktivierung sind außerdem eine an verschiedenen Stellen mögliche Lysin Lys-63-verbundene Ubiquitinierung (GeneCards, 2021) sowie eine *O-linked β -N-Acetylglucosaminylierung* (O-GlcNAcylierung) von TAB1 an Ser-395 (Pathak *et al.*, 2012).

Durch unterschiedliche Modifikationen von TAK1 und seinen Adapterproteinen kann also gezielt auf verschiedene Signale reagiert werden und die nachgeschalteten Kaskaden

spezifisch eingeleitet werden. Beispielsweise muss für den MAPK-Signalweg TAK1 vollständig phosphoryliert werden, während für die IKK-Aktivierung die basale Aktivität von TAK1 möglicherweise ausreicht. Des Weiteren wird eine gegenseitige Regulation von Phosphorylierung und Ubiquitinierung angenommen (Abb. 1.8 b; Chen *et al.*, 2015).

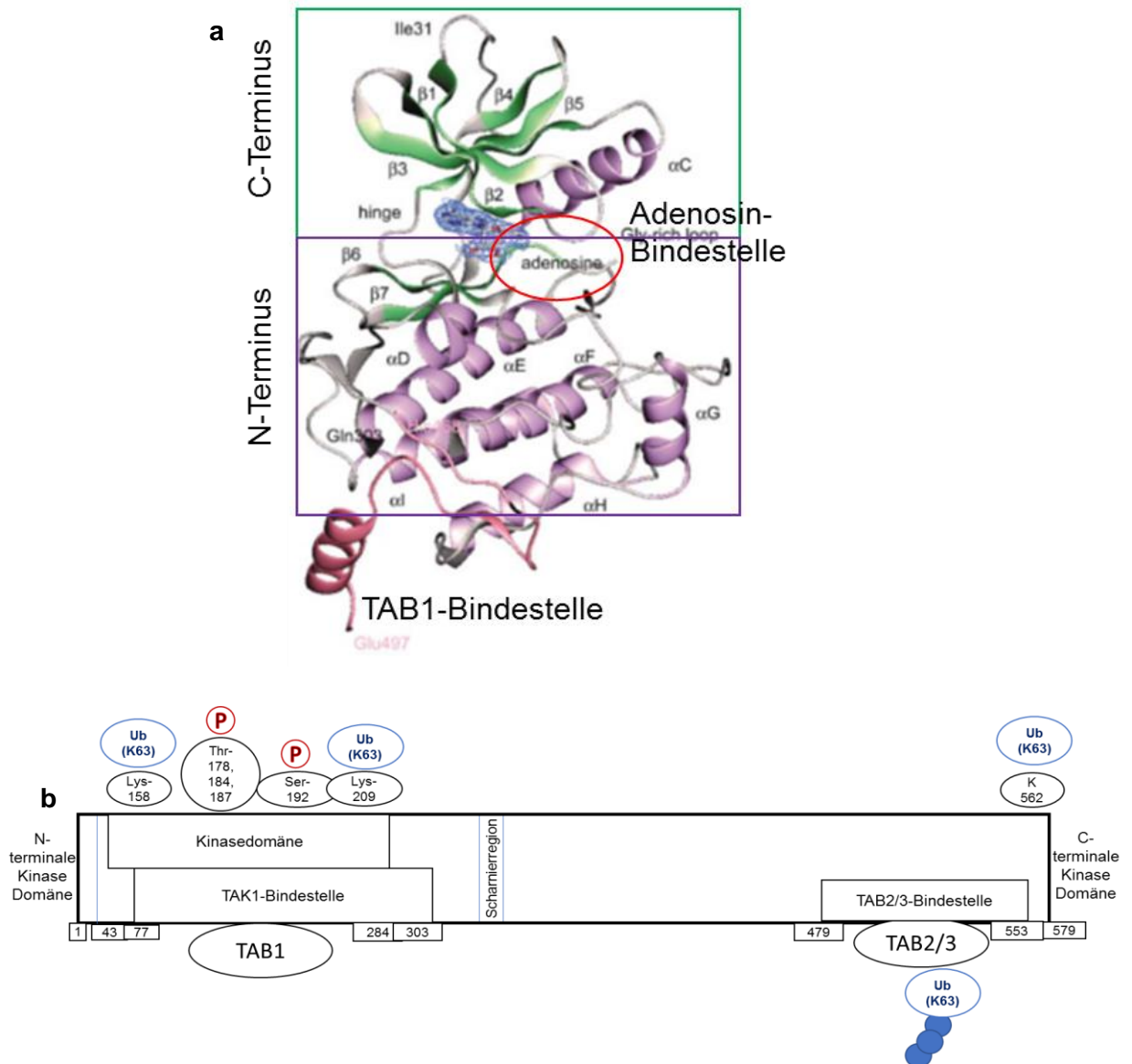


Abb. 1.8: Struktur von TAK1. a) Schematische Darstellung des TAK1-TAB1-Fusionsproteins: N-terminale Kinasedomäne mit fünf antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix zur β 3- β 4-Strangverbindung, C-terminale Kinasedomäne hauptsächlich aus α -Helices bestehend mit Substratbindestelle für TAB1 (Ashaq *et al.*, 2019). Abb. modifiziert nach Brown *et al.*, 2005. b) Posttranslationale Modifikationsstellen von TAK1. Abb. modifiziert nach Roh *et al.*, 2014 und Hirata *et al.*, 2017.

1.2.2.3 Herunterregulation der TAK1-Aktivität

Eine dauerhafte Erhöhung der TAK1-Aktivität stört die Zellhomöostase und das TAK1-Aktivitätsniveau wird durch TAK1-Inaktivierung auf die Ausgangssituation zurückgebracht (Abb. 1.9). Hierfür wird Thr-187 unter TAB2-Mitwirkung durch die Proteinphosphatasen (PP) dephosphoryliert (Kajino *et al.*, 2006). Für die Aktivierung der PP6 sind TAB2 und die Bindung an eine K63-Polyubiquitinkette erforderlich (1) (Roh *et al.*, 2014). In Abhängigkeit des Stimulus sind verschiedene Phosphatasen an der Inaktivierung beteiligt (Dai *et al.*, 2012). Im Sinne eines Feedback-Mechanismus kann weiterhin die Kinase p38 α TAB1 phosphorylieren, was wiederum die Thr-187-Dephosphorylierung von TAK1 bewirkt (2) (Roh *et al.*, 2014).

Eine weitere Möglichkeit ist die Inaktivierung über die *CYLD Lysine 63 Deubiquitinase* (CYLD) und Deubiquitinase A20 (Roh *et al.*, 2014) im Komplex mit der E3-Ubiquitinligase ITCH (Lee *et al.*). Sie spalten die für nichtproteasomale Modifikation relevanten, über Lys-63-verbundenen Ubiquitinketten und katalysieren dafür die Bildung von über Lys-48-verbundenen Ubiquitinketten, welche Proteine für die proteasomale Degradierung markieren (Lee *et al.*). Dadurch werden die inflammatorischen Signale von TAK1 beendet (4). Ein Mangel an ITCH oder CYLD führt zu verstärkter Entzündungsreaktion und Tumorentstehung. Die Genexpression von ITCH und CYLD wird durch NF- κ B induziert und sorgt für die Hemmung des NF- κ B- und JNK-Signalwegs (5) (Ahmed *et al.*, 2011).

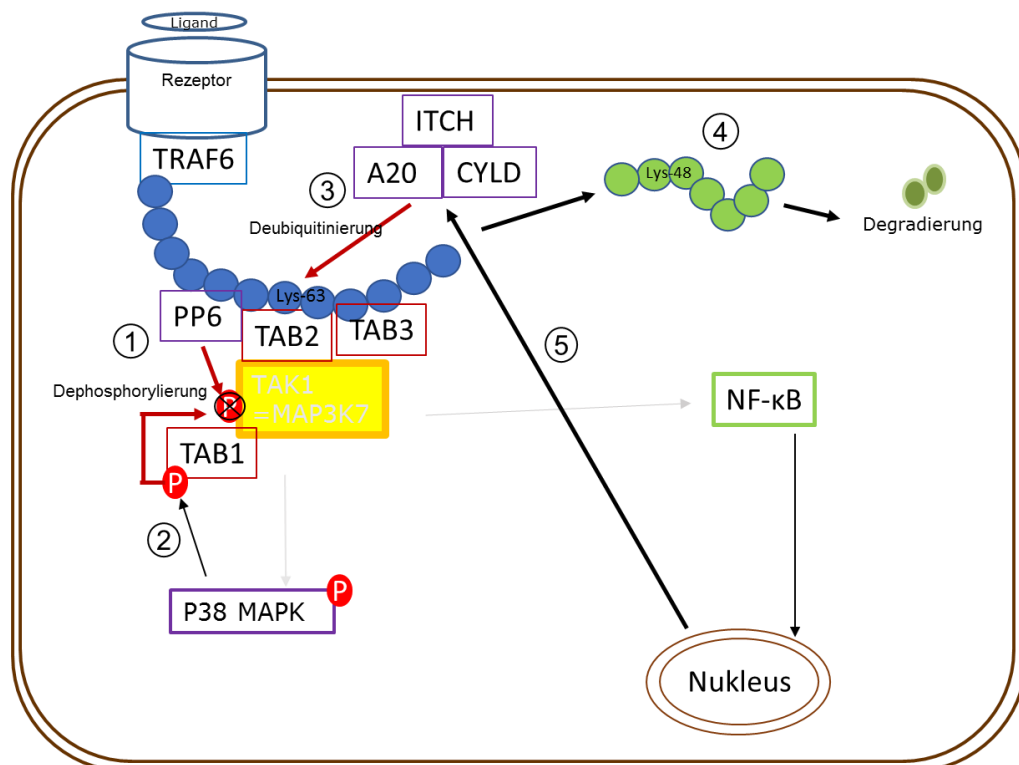


Abb. 1.9: Mechanismus der Inaktivierung von TAK1. Mechanismus 1: Dephosphorylierung von Thr-187. 1) PP6: Dephosphorylierung von TAK1. 2) Negativer Feedbackmechanismus: p38 phosphoryliert TAB1, dieses dephosphoryliert TAK1. Mechanismus 2: Regulation der Polyubiquitinierung. 3) bis 5) Deubiquitinierung von TRAF6 (bzw. RIP1 bei TNFR) durch A20, ITCH und CYLD. Nach Roh *et al.*, 2014.

1.2.3 Bedeutung von TAK1 für die Karzinogenese und speziell für das HCC

Hanahan und Weinberg beschrieben im Jahr 2000 sechs Eigenschaften, die Zellen im Laufe der Krebsentwicklung typischerweise erlangen. Hierzu gehören ein ungehemmtes Proliferationspotential, die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsfaktoren, das Verhindern von Apoptose, unbegrenztes Replikationspotential, verstärkte Angiogenese sowie Gewebeinvasion und Metastasierung. 2011 erfolgte eine Erweiterung um die zwei Eigenschaften Deregulation der zellulären Energiekontrolle und Ausweichen vor dem körpereigenen Immunsystem. Die Liste wurde weiterhin durch genomische Instabilität bzw. Mutation und tumorfördernde Entzündung erweitert (Hanahan und Weinberg, 2011). TAK1 ist bei vielen dieser Prozesse involviert und besitzt dabei teils Zellhomöostaseaufrechterhaltende und teils tumorfördernde Eigenschaften.

Die Funktionen von TAK1 können sich je nach Organ, Krebsart, Zellart, Tumorstadium und Ätiologie stark unterscheiden, weshalb die Rolle von TAK1 kontrovers erscheint. In manchen Fällen führt eine TAK1-Deletion zu Krebs, in anderen Fällen wird die Inhibition als Therapieansatz in Betracht gezogen (Mukhopadhyay und Lee, 2020). In einigen Krebsentitäten wie dem Prostatakarzinom, der akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) sind TAK1-Deletionen beschrieben worden, beim Ösophagus-, Schilddrüsen-, Magen-, Ovarialkarzinom sowie dem Osteosarkom wurde dagegen eine hohe Expression beobachtet (Mukhopadhyay und Lee, 2020). Auch im HCC gibt es zu TAK1 kontroverse Forschungsergebnisse. TAK1 wurde insbesondere in Mausmodellen intensiv untersucht: Sowohl eine Deletion wie auch eine Überaktivierung führte in Hepatozyten u.a. zur Entstehung von Steatohepatitis, dysplastischen Knoten und HCCs (Roh *et al.*, 2014). Größere, systematische Untersuchungen an humanem Gewebe wurden bislang jedoch noch nicht durchgeführt.

1.3 Ziel der Dissertation

Die molekularen Mechanismen, die zur Entwicklung chronisch-inflammatorischer Prozesse in der Leber und zur Entstehung von HCCs führen, sind bislang nur ansatzweise aufgeklärt. Ein besseres Verständnis der Hepatokarzinogenese könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien beitragen. Außerdem liefern die bisher gebräuchlichen Klassifikationen meist keine zufriedenstellende Prognoseeinschätzung. Die klinisch etablierten Tumor-Klassifikationen liefern zwar eine recht robuste Einteilung in prognostische Gruppen, aber da der klinische Verlauf des einzelnen Patienten hochvariabel ist, gibt es durchaus noch Spielraum zu einer verbesserten Prognoseeinschätzung, z.B. anhand molekularer Marker.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte TAK1 als Aktivator des proinflammatorisch und antiapoptotisch wirksamen Transkriptionsfaktors NF- κ B im HCC untersucht werden. Für

diesen Zweck wurde ein umfassender Tissue Microarray (TMA) mit Proben von 871 HCCs sowie zugehörigen zirrhatischen und nicht-zirrhatischen Leberproben von insgesamt 561 Patienten immunhistochemisch gefärbt. Für das Patientenkollektiv lagen umfangreiche klinische Daten vor. Die immunhistochemisch bestimmte Proteinexpression sollte dann mit dem Patientenüberleben und weiteren klinisch-pathologischen Parametern korreliert werden. Zudem sollte die Expression von TAK1 auch auf mRNA-Ebene in der öffentlich zugänglichen TCGA-Kohorte untersucht werden (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017). Im Anschluss sollte eine Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen *in vitro* erfolgen, um weitere Erkenntnisse über die Tumorgenese des HCCs im Menschen zu gewinnen. TAK1 sollte auch auf die Eignung als neuer prognostischer und ggf. prädiktiver molekularer Biomarker hin untersucht werden, um den Krankheitsverlauf eines Patienten besser abschätzen zu können. Dadurch könnte sich die Entscheidungsgrundlage für behandelnde Ärzte für die weitere Therapieplanung verbessern, etwa im Hinblick auf Aggressivität und Ausmaß der einzuleitenden Therapie.

Insbesondere sollten im Rahmen der Dissertation folgende Fragestellungen analysiert werden: Liegt im HCC gegenüber dem umliegenden, nicht-tumorösen Lebergewebe eine veränderte Regulation von TAK1 auf Proteinebene vor? Wie sieht es auf mRNA-Ebene aus? Wie verhalten sich die klinisch-pathologischen Parameter in Bezug auf die TAK1-Expression? Eignet sich unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse TAK1 als prognostischer Marker für das HCC? Welchen Einfluss hat TAK1 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen? Lassen sich die an Mausmodellen gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Geräte und Hersteller

Gerätebezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Casy Cell Counter und Analyzer OLS®	Omni Life Science GmbH und Co.KG, Bremen, Deutschland
Chemilumineszenzimager Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
CO ₂ -Inkubator BBD 6220 Thermo Scientific Heraeus™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dampfgarer Braun	Braun GmbH, Kronberg/Taunus, Deutschland
Digital Sonifier® SLPe	Emerson Electric Company, Missouri, USA
Färbeautomat Dako Cytomation Autostainer plus (Immunhistochemie)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Färbeautomat Leica ST 4040 Linear Stainer (H.E.)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Färbeküvetten	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Gefrierschrank	Siemens, Deutschland
HARTMANN-Wärmeschrank	PAUL HARTMANN AG, Heidenheim, Deutschland
Homogenisator	Precellys 24 lysis und homogenization, bertin technologies, Darmstadt, Deutschland
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems
Kühl- und Gefrierschrank 319	Kombi Bosch KGE 3616, Luxemburg
Kühlschrank Liebherr KBES 4260	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop BZ-9000 (Proliferation)	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Lichtmikroskop Eclipse TS100-F	Nikon, Tokyo, Japan
Lichtmikroskop Leica DMI 6000B	Leica Mikrosystems GmbH
Magnetrührer RETbasic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
Mikrozentrifuge MIKRO 120	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Mikrowelle (Agarosegel)	Bosch, Luxemburg
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien USA
Mini-sub cell GT	Bio-Rad Laboratories
pH-Labormessgerät inoLab®	WTW-a xylem brand, Dinslaken, Deutschland
PIPETBOY acu	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® 10, 100, 1000	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten PIPETMAN® Classic P10, P100, P1000	Gilson® Inc, Middleton, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories
PowerPac™ 3000	Bio-Rad Laboratories

QuantStudio 3 Realtime PCR System	Thermo Fisher Scientific
RM5 Assistant (Rollenmischer)	Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
Schüttelinkubator	Bakterieninkubator 3032, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Scotsman Flockeneisbereiter AF80	Scotsman, Illinois, USA
Spektralphotometer NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Spektrophotometer Tecan Spark 10M	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Sterilbank HERAsafe KS12	Thermo Fisher Scientific
Systemmikroskop Leica DM LM	Leica Mikrosysteme GmbH
Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific
Thermo Haake® heating circulator (Wasserbad)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
ThermoMixer® C (Heizblock)	Eppendorf AG
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories
Trockenschrank Heraeus™ Kelvitron® (Zellkultur für Medium/PBS)	Thermo Fisher Scientific
Trockenschrank/Wärmeschrank Heraeus Function Line B6	Thermo Fisher Scientific
Universalzentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X3	Thermo Fisher Scientific
UV-Transilluminator	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Vacunsafe (Absauger)	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wippschüttler CAT ST 5	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved, 0,1 mm/0,0025 mm ²	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Gosheim, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller

Material	Bezeichnung	Hersteller
6-Well Platten 12-Well Platten	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
96-Well Platte (Realtime-PCR)	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific
Abdeckfolie für 96-Well Platten	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser	Menzel Gläser, 24x 60mm	Thermo Fisher Scientific
Eppendorf Tubes® 1,5 ml	Safe-Lock Tubes, PCR clean	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 1250 µl	SafeSeal SurPhob, steril, Low Binding, graduiert, frei von DNA, DNase, RNase, Pyrogen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material und Methoden

Inserts für Migrationsassay	Ibidi culture-insert 2 well	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
Nitrocellulose Membran	0,45 µm	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Objektträger Superfrost® Plus (25x75x1,0 mm)	Menzel Gläser, geschliffen	Thermo Fisher Scientific
Pasteurpipetten	ohne Wattestopfen, Kalksoda-Klarglas, 150 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Cellstar®, Sapphire PCR-Reaktionsgefäß, 0,2 ml	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl	Refill System Nerbe	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Rasierklingen	Rasierklingen Heavy Duty Industrial Blades	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
Skalpell	Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturschale 6 cm (60x 15mm), 10 cm (100x 20mm)	Cellstar®, steril, frei von DNase, RNase, DNA, Pyrogen	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifugen-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Cellstar® Tubes, steril, konischer Boden, Schraubverschluss,	Greiner Bio-One GmbH

2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Reagenzien

Tab. 2.3: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller oder Bezugsquelle

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidstamm-Lösung mit 0,8 % Bisacrylamid	Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH
Agarose Pulver	UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Kalifornien, USA
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH
Bradford Reagenz	Bio-Rad Protein Assay, Farbstoff, Konzentrat	Bio-Rad Laboratories
Bromphenolblau	Bromphenolblau für Natriumsalze	Carl Roth GmbH
BSA (bovines Serumalbumin)	Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH
Chloroform	Trichlormethan Methylidyntrichlorid	Sigma-Aldrich
Coumarinsäure	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
DTT	Dithiothreitol	BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eindeckmedium Mounting Medium	Entellan	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Mowiol (ProLong™ Gold Antifade Reagent)	Thermo Fisher Scientific
Essigsäure	Essigsäure Rotipuran® 100 %	Carl Roth GmbH

Material und Methoden

Ethanol	absolut, $\geq 99,8 \%$	Honeywell Research Chemicals, Seelze, Deutschland
	absolut	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
	96 %	Brenntag GmbH, Mülheim an der Ruhr, Deutschland
Formaldehydlösung	36,6 - 38 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich
Glycerin	Glycerol Reagent Plus™	Sigma-Aldrich
Glycin	$\geq 99 \%$, 75,07 g/mol	Carl Roth GmbH
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor	Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific,
Isopropanol	2-Propanol $\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
Luminol	Luminol $\geq 97 \%$	Sigma-Aldrich
Methanol	$\geq 99,8 \%$	Honeywell Research Chemicals, Seelze, Deutschland
Milchpulver	Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nukleasefreies Wasser		Qiagen, Hilden, Deutschland
PEI-Reagenz	Polyethylenimine Stammlösung 1,67 mM (in PBS)	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	P0781	Sigma-Aldrich
PeqGREEN	DNA/RNA-Farbstoff, 1 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Salzsäure rauchend 37 % Rotupuran®	Carl Roth GmbH
SDS	Dodecylsulfat in Pellets, M _r 288,4	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
SYBR™ Green	SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
TEMED	Tetramethylethylenediamin $\geq 98,5 \%$	Carl Roth GmbH
Tris	121,14 g/mol	AppliChem GmbH
Triton® X100	t-Octylphenoxy-Polyethoxyethanol	Sigma-Aldrich
TRIzol	TRI Reagent™ Solution, RNA Isolation Reagent	Invitrogen, Kalifornien
Trypsin	Trypsin-EDTA Solution (0,25 %)	Sigma-Aldrich
Tween 20	Tween	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Xylol		VWR International GmbH

2.1.4 Kits

Tab. 2.4: Verwendete Kits

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Gelelektion	GenElute™ Gel Extraction Kit	Sigma-Aldrich
PCR	S7 Fusion Polymerase	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
pJet Kit	CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific
Plasmidextraktion klein	GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
Plasmidextraktion mittel	GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich
Reverse Transkription	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
Semiquantitative PCR	ReadyMix™ REDTaq® PCR Reaction Mix MgCl ₂	Sigma-Aldrich

Tab. 2.5: Kit für die immunhistochemische Färbung

Substanz	Hersteller/Lieferant
Aqua dest. Spüllösung steril	AlleMAN Pharma GmbH, Rimbach, Deutschland
EnVision™ FLEX Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark Agilent, Santa Clara, US
EnVision™ FLEX DAB + Chromogen	
EnVision™ FLEX Flex Hematoxylin	
EnVision™ FLEX /HRP	
EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	
EnVision™ FLEX Substrate Buffer	
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x), Citrat-Puffer, pH 6,1	
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution High (50x), Tris/EDTA-Puffer, pH9	
EnVision™ FLEX Wash Buffer (29x), Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7,6	
EnVision™ FLEX + Rabbit (Linker), Stabilisierungsprotein	
EnVision™ FLEX + Mouse (Linker), Stabilisierungsprotein	

2.1.5 Standards, Größenmarker

Tab. 2.6: Größenmarker

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	1 kb, 100 bp DNA Ladder	BioLabs®Inc., Ipswich, England
Proteinbestimmung	Purified BSA 10 mg/ml	BioLabs®Inc.
Western Blot	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

2.1.6 Puffer und Medien

Die Puffer wurden jeweils mit Reinstwasser angesetzt, sofern nicht anders beschrieben.

Tab. 2.7: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration
6-fach Protein-Probenpuffer	Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerin DTT Bromphenolblau	350 mM 10,28 % (m/V) 36 % (v/v) 600 mM 1 Spatelspitze
10-fach Lysispuffer	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA	10 % (v/v)
10xNEBuffer™ CutSmart	BioLabs®Inc. (gebrauchsfertig)	10 % (v/v)
10xNEBuffer™	BioLabs®Inc. (gebrauchsfertig)	10 % (v/v)
„CO-IP“-Puffer	Tris HCl EDTA NaCl	50 mM 15 mM 100 mM
LB-Medium	Hefeextrakt (5 g/l) Trypton (10 g/l) Natriumchlorid (0,5 - 10 g/l) Agar (15 g/l)	pH 7 (NaOH)
PBS Zellkultur	Dulbeccos´ s Phosphate Buffered Saline (DPBS), ohne Calcium Sigma-Aldrich	gebrauchsfertig
PBS	Sigma-Aldrich	gebrauchsfertig
Puffer A	HEPES pH 7,9 MgCl ₂ KCl	10 mM 1,5 mM 10 mM
Puffer B	HEPES pH 7,9 Glycerin MgCl ₂ HCl EDTA NaCl	15 mM 12,5 % 1,5 mM 5 mM 0,1 mM 0,45 M
SDS-Page Laufpuffer 10-fach	Tris Glycin SDS	250 mM 1,92 M 35 mM pH 8,3
SDS-Sammelgelpuffer	Tris-HCl	500 mM pH 6,8 (HCl)
SDS-Trenngelpuffer	Tris-HCl	1,5 mM pH 8,8 (HCl)
Semidry Blot-Puffer 10-fach	Tris Glycin SDS	480 mM/58,2 g 390 mM/29,3 g 13 mM/ 10 % 37,5 ml pH 9,1
Semidry Blot Puffer 1- fach	Semidry Blot Puffer (10-fach) Methanol	10 %(v/v) 20 % (v/v)
„Stripping“ Puffer 1	Glycin NaCl	200 mM 500 mM pH 2,8 (HCl)
„Stripping“ Puffer 2	Glycin NaCl	200 mM 500 mM pH 2,2 (HCl)

Material und Methoden

TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA Puffer) 50-fach	Tris Eisessig EDTA	40 mM 20 mM 1 mM pH 8,6
TBS 20-fach (Tris-buffered Saline)	20-fach Pulver mit HCl eingestellt	pH 7,4 (HCl)
TBST	TBS (20-fach) Tween 20	5 % (v/v) 0,05 % (v/v)

Tab. 2.8: Kulturmedien.

Verwendung	Medium	Zusatz	Hersteller
Zellkultur	Gibco® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l D-Glucose, L- Glutamine und Pyruvate	10 % FCS F7524 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA 6 ml Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific

2.1.7 Antikörper und Enzyme

Tab. 2.9: Primärantikörper

Primär- antikörper Anti-	Tier- spezies	Verdün- nung	Hersteller (Firma)	Typus	Artikel- nummer	Retrieval solution
Aktin (C4)	Maus	Immunblot 1:10.000	Sigma- Aldrich	mono- klonal	(MAB1501)	-
gespaltene Caspase 3 (Asp175) (5A1E)	Kanin- chen	IHC 1:200	Cell Signaling	mono- klonal	9964	Citratpuffer, pH 6,1 (Dako GV805)
Drosha (D28B1)	Kanin- chen	Immunblot 1:1000	Cell Signaling	mono- klonal	3364	-
FLAG	Maus	Immunblot 1:3000 IF 1:100	Sigma Aldrich	mono- klonal	F1804	-
Glutamin- synthetase (GS-6)	Maus	IHC RTU (ready-to- use)	Roche	mono- klonal	760-4898	Cell condition solution (Roche, 950-124)
Glyceralde- hyd-3- phosphat Dehydro- genase (GAPDH) (6C5)	Maus	Immunblot 1:10.000	Santa Cruz	mono- klonal	sc-32233	-

Material und Methoden

Glypican3 (GC-33)	Maus	IHC RTU	Roche	mono-klonal	790-4564	Cell condition solution (Roche, 950-124)
HSP 70/HSC 70(W27)	Maus	IHC 1:250	Santa Cruz	mono-klonal	Sc-24	Cell condition solution (Roche, 950-124)
4 Hydroxy-nonenal [HNEJ-2]	Maus	IHC 1:900	abcam	mono-klonal	ab48506	-
NAK/TBK1 [EP611Y]	Kaninchen	IHC 1:300	abcam	mono-klonal	ab40676	-
NF-κB p52 (E.212.1)	Kaninchen	Immunblot 1:1000	Thermo Fischer Scientific	mono-klonal	MA5-15110	-
Poly-ADP-Ribose-Polymerase (C2-10)	Maus	Immunblot 1:1000	BD Pharmingen	mono-klonal	556362	-
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3)	Kaninchen	IHC 1:200	Cell Signaling	mono-klonal	9718	Citratpuffer, pH 6,1
Phospho-Histon H3	Kaninchen	IF 1:250	Merck	poly-klonal	06-570	-
RelB (C-4)	Maus	IHC 1:500 Immunblot 1:1000	Santa Cruz	mono-klonal	sc-48379	-
SATB1 (P472)	Kaninchen	Immunblot 1:1000	Cell Signaling	poly-klonal	3643	-
TAK1 (JM73-19)	Kaninchen	IHC 1:25 Immunblot 1:1000	novusbio	mono-klonal	NBP2-67180	Citratpuffer, pH 6,1

Abk.: RTU = Ready-To-Use, IHC = Immunhistochemie, IF = Immunfluoreszenz

Tab. 2.10: Sekundärantikörper für den Immunblot

Antikörper	Tierspezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnr.
Anti-Maus IgG <i>Highly cross-absorbed</i>	Ziege	1:3000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA	A16078
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:3000	Bio-Rad Laboratories, Inc.	170-6515
Anti-Maus IgG	Ziege	1:3000	Bio-Rad Laboratories, Inc.	170-6516

Tab. 2.11: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Tierspezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnr.
Alexa Flour® 488 goat anti- mouse IgM	Ziege	1:250	Invitrogen	A21042
Alexa Flour® 546 goat anti- rabbit IgG	Ziege	1:250	Invitrogen	A11011

Tab. 2.12: Fluoreszenzfarbstoffe

Abkürzung	Bezeichnung	Darstellung	Verdünnung	Hersteller
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindol	DNA, Zellkerne	1:10.000	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA

Tab. 2.13: Enzyme

Bezeichnung	EC-Nummer	Enzymaktivität	Hersteller	Artikelnr.
BamHI	3.1.21.4, Restriktionsenzym	20.000 U/ml	BioLabs®Inc.	R0136S
HindIII	3.1.21.4, Restriktionsenzym	20.000 U/ml	BioLabs®Inc.	R0104S
Kollagenase IV	3.4.24.xx Metalloendopeptidase (Hydrolase)	> 125 CDU/mg	Sigma-Aldrich	C5138
RedTaq	2.7.7.7 (Nucleotidyl)transferase		Sigma-Aldrich Chemie GmbH Eschenstrasse 5 D-82024 Taufkirchen	R2523
XhoI	3.1.21.4, Restriktionsenzym	20.000 U/ml	BioLabs®Inc.,	R0146S

2.1.8 Vektoren

Sämtliche in der Arbeit verwendeten Plasmide enthielten Resistenzgene gegen Ampicillin/Carbenicillin. Die Vektorkarten von pcDNA3 und pJET befinden sich im Anhang (Kap. 7.1).

2.1.9 Nukleinsäuren

Forward- und Reverse- bzw. Stop-Reverse-Primer wurden zur Insert-Amplifizierung eingesetzt, während die Sequenzierungsprimer zur Sequenzierung und Überprüfung des richtigen Insert-Einbaus verwendet wurden (Tab. 2.14). Alle verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 2.14: Primer für die PCR von TAK1 (1842 bp langes Transkript)

Primer	Sequenz 5' → 3'		DNA-Strang	µM
TAK1_for <i>forward</i>	CAT-GGA-TCC-GCC- ACC-ATG-TCT-ACA- GCC-TCT-GCC-GC'	BamHI_Kozak_Start	plus	10
TAK1_rev <i>reverse</i>	CAT-CTC-GAG-TGA- AGT-GCC-TTG-TCG- TTT-GG	XhoI	minus	10
TAK1STP_rev <i>stop reverse</i>	CAT-CTC-GAC-CTA- TGA-AGT-GCC-TTG- TTT-C	XhoI_Stop	minus	10

Tab. 2.15: Primer für die Sequenzierung nach Sanger

Primer	Sequenz 5' → 3'	DNA-Strang	µM
TAK1_seq reverse	AGG-AGC-AGA-TGA-GCC- ATT-AC	minus	10
T7_for	TAA-TAC-GAC-TCA-CTA- TAG-GG	plus	10
reverse	GCT-AGT-TAT-TGC-TCA- GCG-G	minus	10

Tab. 2.16: Primer für die Realtime-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	µM
qTAK1_Exon 12_for	CCT-ATT-CCA-AGC-AGC-CTA-AAC-GG	5
qTAK1_Exon12_rev	GAT-ATG-ACG-ATC-TCA-GGG-ACA	5
qTAK1_Exon 2_for	TGT-TGG-AAG-AGG-AGC-CTT-TG	5
qTAK1_Exon 2_rev	ACG-CTT-TCC-TCT-CAG-ATT-CAC	5

Amplikon: 79 bzw. 98 bp

Tab. 2.17: Primer für die semiquantitative PCR und für die Kolonie-PCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	µM
TAK1_Exon12_for	CTA-CTC-GAC-CAC-TGA-TAA-A	5
TAK1_Exon12_rev	GAG-GTT-GGT-CCT-GAG-GTA-GTA	5

Amplikon: 679, 598 bp

2.1.10 Zelllinien

In der Arbeit wurden drei adhärent wachsende humane Zelllinien verwendet.

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Medium
Huh7	Zellen eines humanen hepatozellulären Karzinoms	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l D-Glucose, L- Glutamin und Pyruvat
HepG2		
HEK293T	embryonale Nierenepithelzellen	

2.1.11 Software

Programm	Herausgeber
Adobe® Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporation, San José, Kalifornien
Chromas Version 2.6.2	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia
Endnote X8 (Bld 10063)	Clarivate Analytics (ehemals Thomson Reuters), Philadelphia, Pennsylvania
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien
HALO	Corrales, NM, USA
Image J-win64.exe	Wayne Rasband (NIH), Maryland, USA
Irfan View 4.38	Irfan Skiljan, Wiener Neustadt Österreich, Europa
Jenoptik Gryphax ®	JENOPTIK AG, Jena, Deutschland
Mikrosoft Excel, 2015	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft Power Point, 2010	
Mikrosoft Word, 2010	
NDP Scan	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
NDP Viewer	Hamamatsu Photonics
QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4	Thermo Fisher Scientific
Sparkcontrol Version 2.1	Tecan Group, Männedorf, Schweiz

2.2 Mikroskopische Methoden

2.2.1 Gewebekollektiv

Für diese Arbeit wurde ein Tissue Micro Array (TMA) von HCCs und zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergeweben gefärbt und analysiert, wodurch die Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher Proben im Hochdurchsatzverfahren ermöglicht wurde. Ein TMA ist ein Multigewebeblock mit Gewebestanzungen von Tumoren und Normalgewebe unterschiedlicher Patienten (Abb. 2.1). Das Kollektiv umfasste 871 HCCs von 561 Patienten und wurde ausschließlich mit Proben aus dem Archiv der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz in Kooperation mit der lokalen Biobank angefertigt (Ridder, 2021). Die Patienten wurden zwischen 1997 und 2017 an der Universitätsmedizin Mainz reseziert. Für die Analysen lag die Zustimmung der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vor (Aktenzeichen: 837.146.17 (10980) und 2018-13857_1; Titel: Immunhistochemische Analysen des Hepatozellulären Karzinoms). Die Patientendaten wurden vor der Analyse anonymisiert und deidentifiziert. Die mittlere Nachverfolgungsdauer betrug 55,2 Monate. Die klinischen Daten wurden von PD Dr. med. Arndt Weinmann (1. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz) und von Prof. Dr. med. Stefan Heinrich (Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt. Neben HCCs und zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergeweben wurden auch Stenzen von Tumorthromben, Metastasen, Rezidiven und dysplastischen Knoten inkludiert (Tab. 2.18, Abb. 2.2).

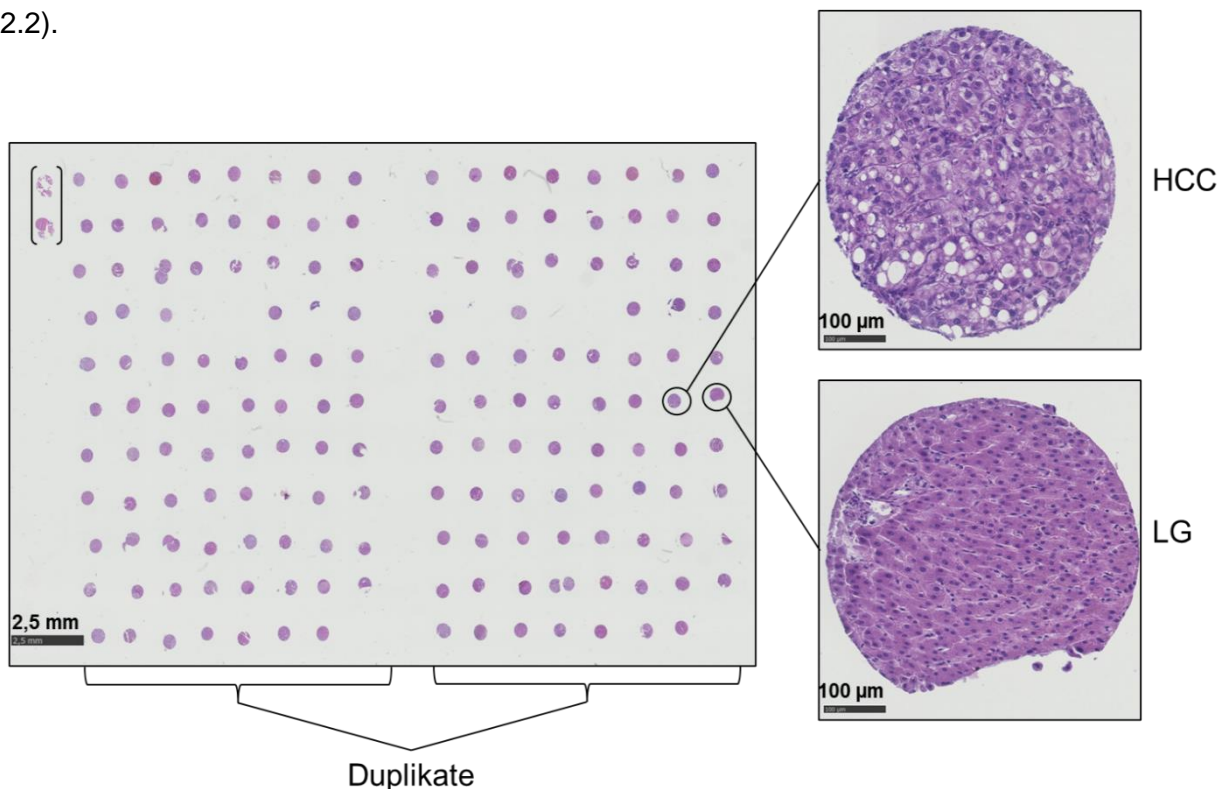


Abb. 2.1: Beispiel einer H.E.-Färbung des HCC-TMAs. Alle Proben eines Objektträgers des TMAs wurden in Duplikaten aufgebracht. Am linken Rand wurden zwei Muskelbiopsien zur Orientierung des Starts aufgebracht. Rechterhand Vergrößerung je einer Stanze eines HCCs sowie des zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebes (LG). Maßstabsbalken jeweils links unten.

Tab. 2.18: Klinisch-pathologische Daten des HCC-Kollektivs

Merkmal		Patientenzahl (Gesamt: n = 561)
Durchschnittsalter (Spanne)		64,6 Jahre (56,4 bis 70,7 Jahre)
Geschlecht	männlich	436 (78 %)
	weiblich	125 (22 %)
Ätiologie	Alkoholabusus	172 (31 %)
	HCV	114 (20 %)
	HBV	106 (19 %)
	NASH	42 (7,5 %)
	Hämochromatose	25 (4,5 %)
BCLC-Stadien	A	104 (19 %)
	B	356 (63 %)
	C	63 (11 %)
	D	38 (6,8 %)
ECOG-Stadien	0-1	533 (96 %)
	2	12 (2,2 %)
	3	6 (1,1 %)
	4	7 (1,3 %)
Vorhandensein einer Leberzirrhose	vorhanden	365 (65 %)
	nicht vorhanden	196 (35 %)
Child-Pugh-Score	A	208 (53 %)
	B	144 (37 %)
	C	38 (9,7 %)
Portalvenenthrombose		65 (12 %)
Gefäßinvasion	abwesend	369 (66 %)
	mikroskopisch	110 (20 %)
	makroskopisch	82 (15 %)

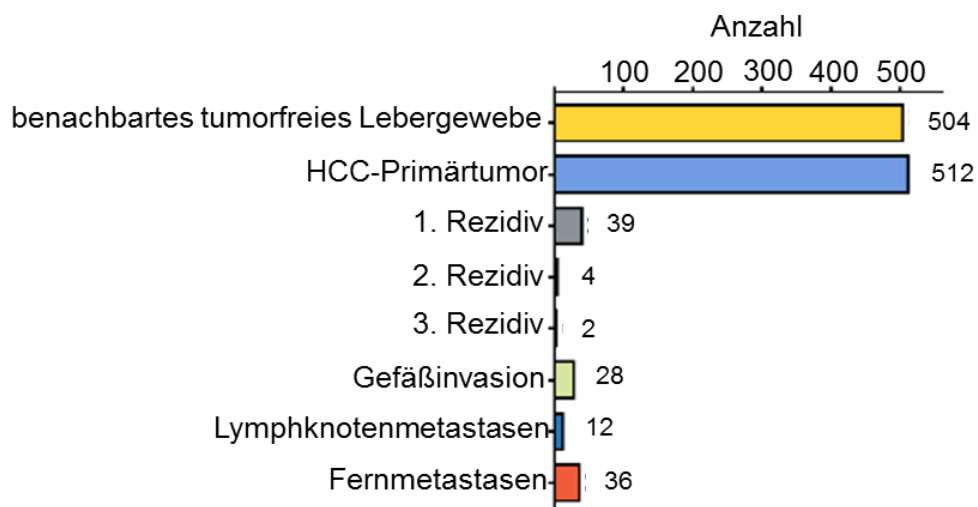


Abb. 2.2: Das HCC-Kollektiv: Darstellung der Anzahl histopathologischer Proben.

2.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Färbung wurde das für den Dako Autostainer (Dako Cytomation Autostainer plus, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien) bestimmte Dako EnVision™ FLEX Nachweissystem (Agilent Technologies) verwendet. Biotinylierte Sekundärantikörper (Brückenantikörper) führten zur Signalverstärkung. Es wurden von allen Reagenzien jeweils 100 µl eingesetzt, nur von Hämatoxylin wurden 150 µl eingesetzt.

Zunächst wurden die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten TMA-Gewebeschnitte deparaffiniert. Hierzu wurden die Gewebeschnitte 20 min im Brutschrank bei 66 °C sowie im Anschluss 15 min in Xylol inkubiert. Im nächsten Schritt folgte die Rehydrierung der Proben mittels einer absteigenden Alkoholreihe mit 100 %, 96 %, 70 % und 0 % Alkohol sowie destilliertem Wasser. Eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung machte die Antigene zugänglich. Für diese manuelle Vorbehandlung wurden die Schnitte im Dampfgerar in der vorgeheizten Pufferlösung bei 97 °C gekocht. In Abhängigkeit des Antikörpers erfolgte die Vorbehandlung entweder für 35 min mit Citratpuffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH, GV805) bei pH 6,1 oder für 20 min in Tris/EDTA-Puffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH, 8024) bei pH 9. Im Anschluss wurde der Tank mit fließendem Leitungswasser für 7 min gekühlt, die Schnitte für 4 min bei Raumtemperatur (RT) in DAKO-Wasch-Puffer (EnVision™ FLEX Wash Buffer) pH 7,6 inkubiert und danach in den Färbeautomaten überführt.

Zu Beginn wurde die endogene Peroxidase durch fünfminütige Behandlung mit wasserstoffperoxidhaltigem Phosphatpuffer (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent) inaktiviert. Nach einem Waschschriff mit DAKO-Waschpufferlösung (EnVision™ FLEX Wash Buffer) wurden die Proben mit dem entsprechend verdünnten Primärantikörper (in EnVision™ FLEX Antibody Diluent) inkubiert. Die Dauer variierte je nach Antikörper und betrug für TAK1 120 min. Nach erneutem Waschen mit Waschpufferlösung erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Brückenantikörper (biotinyliert) für 15 min. Nach einem nochmaligen Waschschriff wurde die enzymkonjugierte Tertiärreagenz (EnVision™ FLEX/HRP) hinzugegeben, 20 min inkubiert und danach die Proben wieder gewaschen. Die nach zwei weiteren Spülvorgängen (EnVision™ FLEX Wash Buffer) zugegebene Chromogenlösung bestand aus einer mit wasserstoffperoxidhaltiger Substratpufferlösung verdünnten DAB-Lösung (EnVision™ FLEX Working Solution). Nach erneutem Waschen (EnVision™ FLEX Wash Buffer) wurde für 3 min mit Hämatoxylin eine Chromogenkontrastierung durchgeführt.

Nach Laufende und Entnahme der TMA-Gewebeschnitte aus dem Färbeautomaten wurden sie 3 min unter fließendes Leitungswasser gehalten und in destilliertes Wasser getaucht. Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %) mit anschließendem Eintauchen in Xylol wurden die Schnitte mit Eindeckmedium (Entellan, VWR International GmbH, Darmstadt) eingedeckt und getrocknet. Gefärbte TMAs wurden mit dem NDP-Nano-Zoomer-Scanner (Hamamatsu Photonics, Japan) in 20-facher Vergrößerung semi-automatisch eingescannt.

2.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

2.2.3.1 Manuelle Auswertung

Für die manuelle Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde der „Immunreaktive Score“ (IRS) verwendet (Abb. 2.3, Remmele und Stegner, 1987). Die Beurteilung der Farbtintensität erfolgte hierbei mit einer Punktzahl von 0 (keine Farbreaktion) bis 3 (starke Farbreaktion) in Analogie an die Auswertung von Hormonrezeptoren bei Mammakarzinomen (Her2neu). Zusätzlich wurde der Prozentsatz der positiven Zellen mit einer Punktzahl von 0 (keine positiven Zellen), 1 (< 10 %), 2 (10 bis 50 %), 3 (51 bis 80 %) und 4 (> 80 %) ermittelt. Die Multiplikation beider Parameter ergab einen Immunreaktiven Score zwischen 0 und 12 als semiquantitative Beurteilung der Färbung (Remmele und Stegner, 1987). Ein IRS von 0 bedeutete Negativität, 1 bis 4 eine schwache, 5 bis 8 eine mäßige und 9 bis 12 eine starke Positivität. Fehlende Stenzen, Stenzen mit ausgeprägter Nekrose sowie Bindegewebe ohne Leber- oder HCC-Gewebe wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Farbtintensität Pos. Zellen	Keine = 0 Punkte	Schwach = 1 Punkt	Mäßig = 2 Punkte	Stark = 3 Punkte
Keine = 0 Punkte	0	0	0	0
< 10 % = 1 Punkt	0	1	2	3
10 - 50 % = 2 Punkte	0	2	4	6
51 - 80 % = 3 Punkte	0	3	6	9
> 80 % = 4 Punkte	0	4	8	12

Abb. 2.3: Immunreaktiver Score. Manuelle Auswertung (Remmele und Stegner, 1987).

2.2.3.2 Automatisierte Auswertung mit der Bildanalysesoftware HALO

Um die zytoplasmatische und nukleäre Immunreaktivität zu bestimmen, wurden die eingescannten Objektträger mit dem digitalen Bildanalyseprogramm HALO der Firma Indica Labs (Corrales, NM, USA) analysiert. Die Segmentierung der TMAs erfolgte mit zuvor angelegten Blöcken, so dass jedes Segment eine Stanze beinhaltete, wodurch es der Patienten-Identifikationsnummer zugeordnet werden konnte.

Ausgangspunkt war die Einstellung Indica Labs CytoNuclear c1.6, an die eine Anpassung der Einstellungen („*Settings*“) über die Eingabeparameter („*Input Parameters*“) an die entsprechende Färbung vorgenommen wurde (Abb. 2.4). Pro Färbung wurde jeweils einheitlich die gleiche Einstellung für alle 19 TMAs verwendet. Der Parameter „Färbung 1 Lokalisation“ („*Stain 1 Localization*“) wurde entweder auf nukleäre oder zytoplasmatische Färbung eingestellt. Anschließend wurden für die Zelllokalisierung nach Auswahl eines repräsentativen Zellkerns mittels *ImageScope EyeDropper Plugin* drei Rot/Grün/Blau-Farbkomponenten zwischen 0 und 1 generiert sowie durch Auswahl eines DAB-gefärbten Areals die Werte des Parameters „Positive Färbung 1“ („*Positive Stain 1*“) erzeugt. Der

Parameter „Färbung 1 minimale optische Dichte“ („*Stain 1 Min OD Weak/Moderate/Strong*“) definierte die Schwellenwerte für die Detektion als schwache, mäßige oder starke Färbung, darunterliegende Werte wurden negativ gewertet. Die individuelle Schwellenanpassung erfolgte je nach Intensität der Färbung und Stärke der unspezifischen Gewebefärbung. Sowohl die „Kern-Kontrast-Schwelle“ („*Nuclear Contrast Treshhold*“) als auch die „Minimale optische Kerndichte“ („*Minimum Nuclear OD*“) beeinflussten die Kern- und damit Zellerkennungsrate und wurden im mittleren Bereich nahe 0,5 gewählt. „Minimale und maximale Kerngröße“ („*Minimum und maximum nuclear size*“) [μm] führte zum Ausschluss von zu kleinen oder zu großen Strukturen. Zur Minimierung einer falsch positiven Detektion von Entzündungszellen anstelle von Hepatozyten wurde ein unterer Wert von 25 gewählt.

Für die Bildausgabe („*Output-Image*“) existierten verschiedene Anzeige-Einstellungen: „Kernfärbung, Positivfärbung für Marker 1 und 2 sowie Färbung 1 Spanne/Aufschlag“ („*Stain 1 markup*“). Im Echtzeiteinstellungsmodus („*real time tuning*“) unter Anzeige von Färbung 1 wurden die Einstellungen überprüft und angepasst, wobei sich ungefärbte Zellen blau, schwach positiv gefärbte gelb, mittelstark gefärbte orange und stark gefärbte Zellen rot darstellten. Nach Erreichen der passenden Einstellungen und nach Analyse der gesamten TMAs wurden die Spots noch einzeln auf Validität überprüft, nicht zu wertende Bereiche annotiert und ausgeschlossen sowie der Spot erneut analysiert.

Zu den *Leistungsparametern* („*Output Parameters*“) zählten die *Gesamtzellzahl* („*Total Cells*“) sowie die Gesamtprozentzahl der als positiv erkannten Zellen in den Zellkernen bzw. im Zytoplasma („*% Stain 1 Positive Cells*“), die noch weiter in schwache, mäßige und starke Positivität aufgeschlüsselt wurde („*% Stain 1 Positive (weak/moderate/strong) Cells*“). Der Prozentsatz ungefärbter Zellen („*% Neutral Cells*“) und die durchschnittliche optische Dichte von Zellkern und Zytoplasma („*Avg Stain 1 Nuclear OD*“) waren ebenfalls Teil der Ergebnisparameter. Die durchschnittliche Zellfläche von zusammengefassten Kern- und Zytoplasmaarealen („*Avg Cell Area*“) wurde in μm^2 angegeben, unterlag jedoch dem Einfluss der Einstellung des maximalen zytoplasmatischen Radius. Der Wert wurde nochmals in durchschnittliche zytoplasmatische Fläche („*Avg Cytoplasmatic Area*“) und durchschnittliche nukleäre Fläche („*Avg Nucleus Area*“) unterteilt. Die Gesamtgewebefläche („*Total Tissue Area*“) berücksichtigte alle innerhalb der minimalen Gewebsdichte („*minimum tissue OD*“) liegenden Regionen. Die Daten der Gesamtanalyse wurden exportiert, in einer *Comma-separated values*-(CSV-)Datei gespeichert und anschließend in eine Excel-Tabelle umformatiert.

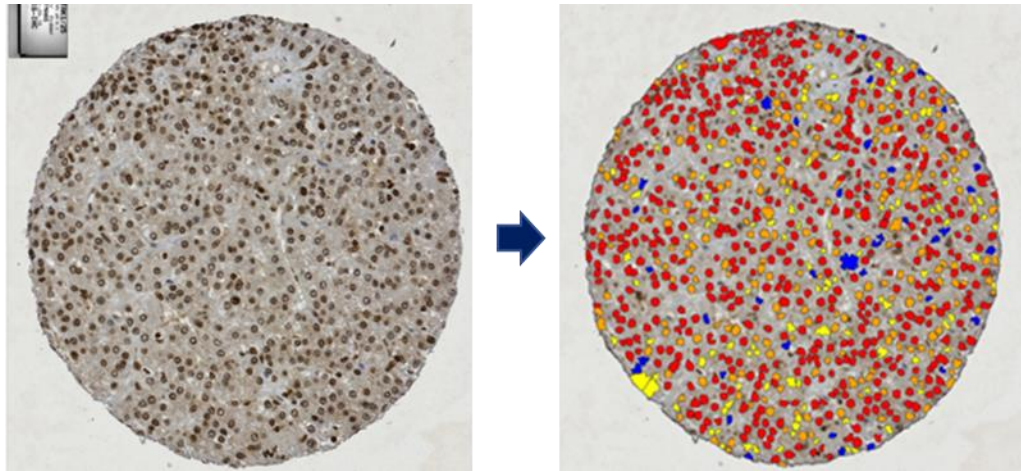


Abb. 2.4: Beispiel für das Layout der HALO-Auswertung. Farbbedeutung: ungefärbt = blau, schwach = gelb, mittel = orange, stark = rot.

2.2.4 Statistische Auswertung

Um eine Assoziation zwischen der TAK1-Expression, dem Patientenüberleben sowie anderer klinisch-pathologischer Parameter zu untersuchen, wurden verschiedene statistische Analysen angewendet:

Die statistischen Methoden, die das humane Patientenkollektiv betrafen, wurden mit dem *R environment for statistical computing* (der R Umgebung) für statistische Berechnungen (Version 4.0.3., R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (RCoreTeam, 2020) durchgeführt, die *in vitro*-Daten mit GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., CA).

Die Daten wurden zuerst auf Normalverteilung überprüft. Bei Normalverteilung wurde der Student's t-test für den Vergleich kontinuierlicher Daten verwendet. Für multiple Gruppenvergleiche kam der One Way ANOVA mit Bonferroni Korrektur zum Einsatz. Der nicht-parametrische Mann-Whitney U Test wurde zum Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen bei ordinalen oder kontinuierlichen Daten angewendet. Der nicht-parametrische Wilcoxon-Rangsummentest wurde verwendet, um zu bestimmen, ob zwei abhängige Proben aus Populationen mit gleicher Verteilung erhoben wurden. Mittels Kruskal-Wallis-Test konnten zwei unabhängige Gruppen verglichen werden, die aus einer abhängigen Variablen und einer Einflussgröße mit drei oder mehr Ebenen bestanden. Für den Vergleich kategorialer Variablen wurde der Chi-Quadrat-Test bzw. für binäre Daten der Exakte Test nach Fisher verwendet. Angegeben wurden die Ergebnisse jeweils als Mittelwert +/- Standardabweichung. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Ergebnisse wurden graphisch als Boxplots dargestellt.

Die Proteinexpression wurde mit Hilfe der Charité Cut-off Finder Funktion in hohe und niedrige Expression eingeteilt (Budczies *et al.*, 2012). Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Plot dargestellt. Der Vergleich der Überlebensraten von Patienten mit hoher und niedriger Expression erfolgte unter Verwendung des Log-rank-Tests. Als Gesamtüberleben

wurde das Intervall zwischen initialer Diagnose und Tod unabhängig von der Ätiologie oder der letzten Verlaufsbeobachtung angesehen. Uni- und multivariate Cox-Analysen wurden für grobe und adjustierte *Hazard Ratios* verwendet. P-Werte < 0,05 (zweiseitig) galten als signifikant. Mittels Cox-Regression wurde die Einflussgröße einer Variablen bei Vorliegen mehrerer beeinflussender Variablen mit Hilfe der Funktionen *coxph* vom *R package survival* (cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html; version 3.1.8) bestimmt.

Zur Untersuchung zweier stetig normalverteilter Variablen auf einen linearen Zusammenhang wurde der Korrelationstest nach Pearson verwendet. Der Korrelationstest nach Spearman untersuchte dagegen einen monotonen Zusammenhang bei zwei stetigen beziehungsweise mindestens einer normalverteilten Variablen (du Prel *et al.*, 2010).

2.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellkulturlinien wurden 100.000 Zellen pro Well in 12-Well-Platten auf 15 mm Glasplättchen ausgebracht. Für die Fixierung der Zellen wurde das Medium entfernt, mit 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und die Zellen 10 min mit 3,7%iger Formaldehydlösung (in PBS) bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 3 mal 5 min mit PBS bei RT gewaschen und die Zellen 30 min bei 37 °C in Blockierlösung (10 % Serum + 0,1 % Triton X-100 in PBS) blockiert. Der Primärantikörper wurde in 50 µl Blockierlösung verdünnt und auf ein Stück Parafilm pipettiert. Die Glasplättchen wurden mit den Zellen nach unten auf den verdünnten Primärantikörper gegeben und 30 min abgedunkelt in feuchter Umgebung bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in Waschlösung (0,1 % Triton X-100 in PBS) gewaschen. Die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper sowie der Kernfarbstoff DAPI wurden in 1 % Serum + 0,1 % Triton X-100 in PBS 1:250 bzw. 1:10.000 verdünnt und wie bei der Inkubation der Primärantikörper verfahren. Zum Schluss wurden die Glasplättchen mit den gefärbten Zellen erneut in Waschlösung getaucht, mit dem Eindeckmedium Mowiol auf Objektträgern fixiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Mikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem Keyence BZ-9000E Mikroskop mit einem 4-fach Objektiv bei 1,6-fachem Zoom mittels BZ-II-Viewer aufgenommen. Pro Glasplättchen wurden 6 zufällig gewählte Bildausschnitte fotografiert. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. Mit DAPI wurde zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Bildausschnitt ausgewählt. Dafür wurde das Bild in 8-Bit umgewandelt und die Zellerkennungsschwelle festgelegt. Zellaggregate wurden folgendermaßen separiert: *Process* → *Binary* → *Watershed*. Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der Zellen über die Funktion: *Analyze* > *Analyze particles* mit folgenden Einstellungen ermittelt: *Size (inch²): 0.05-Infinity*, *Circularity: 0.00-1.00*, *Show: Outlines, add to manager und include holes*. Für die Ermittlung der FLAG/TAK1-(*Protein of Interest*)-positiven und Phosphohiston H3 (Ser10)-positiven Zellen sowie doppelpositiven Zellen wurden die Bilder aller Kanäle zu einem Bildstapel (*stack*)

zusammengefasst und das *Plugin Cell Counter* über *Plugins > Analyze > Cell Counter* initialisiert und manuell ausgezählt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

RNA-Isolierung aus Zellen

Von einer 100 % konfluenten 10 cm Schale Huh7- und HEK293T-Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml Total-RNA-Isolations-Reagenz (Trizol, TRI Reagent™ Solution, RNA Isolation Reagent) von der Platte gespült bzw. lysiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Im Anschluss wurde 200 µl Chloroform zugegeben, 15 s gründlich gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde für 15 min bei 4 °C und 11.200 Upm zentrifugiert. Es bildete sich eine obere wässrige Phase mit der RNA, eine Intermediärphase mit Proteinen und DNA sowie eine untere organische Phase.

Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, ohne dabei Teile der Interphase zu pipettieren. Das gleiche Volumen Isopropanol wurde hinzugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. 10 min Inkubation auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 4 °C und 11.200 Upm führte zur Ausfällung der RNA, der Überstand wurde entfernt und verworfen. Im Anschluss wurde zweimal mit 1 ml 80%igem Ethanol gewaschen, bei 8.800 Upm und 4 °C 5 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zuletzt wurde das Pellet auf dem Heizblock bei 55 °C getrocknet, in 50 µl Wasser rückgelöst und die RNA-Konzentration mittels NanoDrop (s. unten) bestimmt.

Bestimmung der DNA-Konzentration über NanoDrop

NanoDrop bestimmt spektralphotometrisch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Die Abschätzung der Reinheit erfolgte mit Hilfe des Absorptionsverhältnisses von 260/280, das im Idealfall für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen sollte (ThermoFisher, 2010). Zuerst wurde der Leerwert ermittelt, indem 1 µl auf die Messebene pipettiert und deren Absorption gemessen wurde. Im Anschluss wurde 1 µl Probe gemessen und zwischendurch jeweils die Messebene mit einem Papiertuch gereinigt.

Reverse Transkription cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Es wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die 10-fach Reverse Transkriptase (RT) Random Primer wurden zur Klonierung durch 10-fach Oligo-(dT-)Primer ersetzt (Tab. 2.19, Tab. 2.20).

Tab. 2.19: Pipettierschema des 2-fach RT Master Mix

Inhalt	Volumen [μ l]
10x RT Puffer	2
25x dNTP Mix [100 μ M]	0,8
10x RT Oligo dT Primer (statt Random) (Lot: 1647060)	2
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1
RNase Inhibitor	1
nukleasefreies Wasser	3,2
→ Gesamt	10
RNA-Verdünnung	10 (2 μ g RNA ad 10 μ l mit nukleasefreiem H ₂ O)

Tab. 2.20: Cyclor Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde für die Amplifikation eines durch zwei Primer flankierten DNA-Bereichs *in vitro* angewendet (Mullis *et al.*, 1992).

Tab. 2.21: Pipettierschema für PCR-Reaktionen in einem 25 μ l-Ansatz

Komponenten	Volumen [μ l]
5x HF-Puffer	5
10 mM dNTP-Mix	0,5
Template DNA: cDNA Huh7	0,5
DMSO 5 %	1,25
S7 Fusion Polymerase	0,25
Forward Primer	1,25 (10 μ M)
Reverse Primer	1,25 (10 μ M)
nukleasefreies Wasser	ad 25

Tab. 2.22: PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	35
Anlagerung	52/60/65	30	
Elongation	72	60	1
Finale Elongation	72	600	
Lagerung/Kühlen	4	∞	1

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge im elektrischen Feld zu Analysezwecken oder weiteren Aufreinigung der DNA (McDonnell *et al.*, 1977). Für 1%ige Gele wurde 1,25 g Agarose, für 2%ige Gele 2,5 g Agarose in 125 ml Tris-Acetat-EDTA-(TAE-)Puffer durch Aufkochen gelöst. 1,25 µl des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs PeqGreen wurde hinzugegeben und gemischt. Ein Kamm wurde eingesetzt, die Flüssigkeit in den Gelträger gegossen und bis zur Aushärtung abgewartet.

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1-fach TAE-Puffer befüllt und die Proben mit 6-fach DNA-Ladepuffer versetzt. Anschließend wurde der Schlitten mit dem ausgehärteten Gel in die Kammer eingesetzt, der Kamm entfernt und die Proben in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard diente eine 1 Kilobasenpaar-(kbp-) oder eine 100 Basenpaar-(bp-)Leiter (BioLabs; N3232S). Bei 1%igen Gelen wurde eine Spannung von 100 V, bei 2%igen Gelen eine Spannung von 50 V angelegt. Mit dem *Intas Science Imaging Instrument* wurden die Banden durch PeqGreen unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

2.3.4 DNA-Gelextraktion aus einem Agarosegel

Für die DNA-Isolation aus dem Agarosegel wurden Silika-(Kieselsäure-)gelsäulen mit chaotropen Salzen vorbereitet. Durch einen ethanolhaltigen Waschschriff wurden die nur schwach an die Matrix bindenden Proteine und andere Verunreinigungen entfernt und zum Schluss die DNA eluiert. Hierfür wurden die gewünschten Banden auf dem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde mit dem Gen Elute™ Extraktions Kit (Sigma Aldrich) nach Herstellerangaben mit der Zentrifugationsmethode extrahiert. Zum Schluss wurde mit 20 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und mit NanoDrop die Konzentration bestimmt (Reinard, 2010).

2.3.5 Ligation

Mittels Ligation wurden DNA-Fragmente an ihren Enden enzymkatalysiert durch Ligase miteinander verknüpft. Nach der Amplifikation eines Gens mittels PCR wurde das Amplikon nach Aufreinigung in einen linearisierten Vektor inseriert (subkloniert), anschließend das Insert aus dem Plasmid mittels Restriktion wieder herausgeschnitten und dieses in den Zielvektor inseriert (Tab. 2.23; Tab. 2.24). Für die Ligation der DNA-Fragmente in die entsprechenden linearisierten Vektoren wurde folgende Formel für die Mengenermittlung verwendet:

$$\text{Verhältnis Insert/Vektor} = \frac{\frac{\text{Insert in ng}}{\text{Insertlänge in bp}}}{\frac{\text{Vektor in ng}}{\text{Vektorlänge in bp}}}$$

Der Ligationsansatz wurde bei pJET 30 min und beim Zielvektor 10 min bei RT inkubiert.

Tab. 2.23: Pipettierschema für den Ligationsansatz pJet-TAK1

Inhalt	Menge
Insert (PCR-Produkt)	10 ng
pJet blunt cloning Vektor	0,5 µl
2x Puffer	10 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
nukleasefreies Wasser	ad 20 µl

Tab. 2.24: Ligationsansatz für die Ligation von TAK1 in den Zielvektor

Inhalt	Menge
Vektor	50 ng
Insert	1:3 Verhältnis Insert : Vektor
10x –T4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl
T4-Ligase	0,2 µl
nukleasefreies Wasser	ad 20 µl

2.3.6 Plasmid-DNA-Isolierung („Miniprep“)

8 bis 10 Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium + 1:500 Carbenicillin (50 mg/ml) transferiert und bei 37 °C und 150 Upm im Inkubationsschüttler für 16 h kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Genelute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben aus den *E. coli*-Kulturen isoliert. Das Verfahren beruhte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse: Die Bakterienkulturen wurden durch Zentrifugation sedimentiert. Von dem entstandenen Bakterienpellet wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit RNase-haltigem Resuspensions-Puffer durch gründliches Mischen in Lösung gebracht. Der SDS und NaOH enthaltende alkalische Lysisbuffer denaturierte bei entsprechendem pH-Wert überwiegend die chromosomale DNA, während die ringförmige Plasmid-DNA intakt blieb. Die anschließende pH-Neutralisation durch Säurezugabe ließ die zerstörte chromosomale DNA aggregieren und fällte SDS-Proteinkomplexe und RNA aus. Nach 10 min Zentrifugation bei 1000 Upm befanden sich alle Komponenten außer der Plasmid-DNA im Pellet, der Überstand wurde mittels Silika-Säule weiter aufgereinigt. Nach der Elution mit 50 µl nukleasefreiem Wasser wurde die DNA-Konzentration mittels Nanodrop bestimmt (Birnboim und Doly, 1979).

2.3.7 Transformation

Bei der Transformation wurde freie Fremd-DNA in dafür kompetente Bakterien eingebracht. Für die Transformation wurden durch Ca²⁺ kompetente *E. coli* Top 10-Zellen verwendet. Davon wurden 100 µl zum Ligationsansatz hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock im Wasserbad für 45 s bei 42 °C und zweiminütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde auf einer LB-Agar-Platte + 1:500 Carbenicillin (50 mg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.8 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau diente entweder als Testverdau zur Überprüfung, ob das Insert im Vektor vorhanden war oder als präparativer Verdau für die spätere Subklonierung in den Zielvektor (Tab. 2.25). Über den *New England BioLabs* (NEB) cloner v.1.3.14 wurde ein passender Puffer für den Doppelverdau ermittelt.

Tab. 2.25: Pipettierschema des Restriktionsverdaus

Inhalt	Menge [µl]
Plasmid DNA nach der Miniprep	5
Enzym 1	0,1
Enzym 2	0,1
Puffer	2
nukleasefreies Wasser	12,8

Der Testverdau enthielt jeweils für pcDNA3-FLAG und pcDNA3-EGFP die unverdaute Kontrolle, einen Verdau mit einem Restriktionsenzym als Einzelverdau und einen Doppelverdau mit *BamHI* und *XhoI*.

Für den Doppelverdau wurden Vektoren und Inserts mit den gleichen Restriktionsenzymen zur Linearisierung geschnitten, so dass dann zueinander passende kohäsive Enden zur Subklonierung in den Zielvektor vorlagen (Tab. 2.26). Die Ansätze wurden mindestens 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert und über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 2.3.3).

Tab. 2.26: Pipettierschema der Restriktionsverdau-Ansätze

Zielvektor	pcDNA3-TAK1-FLAG		pcDNA3-TAK1		pcDNA3-TAK1-EGFP	
Inhalt	Vektor pcDNA3-FLAG [µl]	Insert (PCR-Produkt TAK1) [µl]	Vektor pcDNA3-FLAG [µl]	Insert (PCR-Produkt TAK1-Stop) [µl]	Vektor [µl]	Insert (PCR-Produkt TAK1) [µl]
Puffer <i>Cut Smart</i>	2	5	2	5	2	5
<i>BamHI</i>	1	1	1	1	1	1
<i>XhoI</i>	1	1	1	1	1	1
Vektor/Insert	2,24	15	2,24	15	1,44	15
nukleasefreies Wasser	ad 20 → 13,76	ad 50 → 28	ad 20 → 13,76	ad 50 → 28	ad 20 → 14,56	ad 50 → 28

2.3.9 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine auf einer PCR basierenden Methode, um spezifische DNA-Sequenzen in Bakterienklonen nachzuweisen. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde die Kolonie von der Platte in ein PCR-Tube transferiert, die Bakterien im PCR-Ansatz gelöst und mit der Pipettenspitze eine 5 ml Kultur angeimpft (Tab. 2.27, Tab. 2.28).

Tab. 2.27: Ansatz der Kolonie-PCR

Inhalt	Menge [μ l]
Primer TAK1 Exon 12 for (10 μ M)	0,3
Primer TAK1 Exon 12 rev (10 μ M)	0,3
RedTaq	7,5
Wasser	6,9

Tab. 2.28: Protokoll für die Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	30	34
Anlagerung	58	60	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	5	1
Kühlung	4	∞	

Im Anschluss wurden die Produkte auf einem 2%igen Agarosegel ohne Zugabe von Probenpuffer aufgetrennt. Der Probenpuffer war bereits im RedTaq Reagenz enthalten. Bei positiven Klonen wurde am Folgetag die Plasmid-DNA-Isolierung dieser Klone durchgeführt (Kap. 2.3.6).

2.3.10 Sequenzierung

Fertig klonierte Konstrukte wurden kommerziell über StarSeq gemäß der Kettenabbruchmethode sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Für einen Sequenzierungsansatz wurden 600 ng Plasmid-DNA und 1 μ l Sequenzierungsprimer (10 μ M) mit nukleasefreiem Wasser auf 7 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Sequenzen wurden mit dem CloneManager v.8 mit den unter ensembl.org annotierten Sequenzen verglichen. Mit Chromas v.2.6.6 wurde das Chromatogramm auf Mutationen und Mischklone überprüft.

2.3.11 Glycerinkultur

Für eine dauerhafte Lagerung der Plasmide wurden Glycerindauerkulturen angelegt, um bei aufgebrauchter Plasmid-DNA auf diese zurückgreifen zu können. Dafür wurden 990 μ l einer Übernachtskultur mit 200 μ l Glycerin versetzt, kurz gemischt und bei -80° C eingefroren.

2.3.12 Plasmid-DNA-Isolierung („Midiprep“)

Bei passender Sequenz wurden 100 ml LB-Medium mit 1:500 Carbenicillin versetzt, in einem 1l-Kolben mit 50 μ l Bakterienvorkultur angeimpft und 16 h über Nacht auf dem Schüttler bei 37° C und 150 Upm inkubiert. Die 100 ml Kultur wurde zweimal bei 4000 g 15 min bei 4° C in einem 50 ml Röhrchen zentrifugiert und die DNA nach Angaben des Herstellers aus dem Bakterienpellet isoliert. Abweichend von den Herstellerangaben wurde nach dem Waschen mit der zweiten Waschlösung zusätzlich 5 min bei 3000 g leer zentrifugiert, sowie 1 ml

nukleasefreies Wasser statt Elutionspuffer für die Elution verwendet. Nach der Fällung wurde in 300 µl Wasser rückgelöst und die DNA-Konzentration mit Nanodrop bestimmt.

2.3.13 Quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine Methode zur Quantifizierung der während einer PCR gebildeten DNA-Menge. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green R interkalierte mit doppelsträngiger DNA. Das während eines jeden PCR-Zyklus gemessene Fluoreszenzsignal stieg proportional zur Menge des gebildeten Amplikons an. Am Ende des Laufes erfolgte die Quantifizierung in der exponentiellen Phase, in der die Amplifikation unter optimalen Bedingungen stattfand. Der *cycle threshold*-(Ct)-Wert beschrieb dabei den Zyklus, in dem diese Bedingungen erstmals eintrafen und damit das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal überstieg. Am Ende der PCR-Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei führte eine kontinuierliche Temperaturerhöhung zur Trennung der beiden Einzelstränge eines doppelsträngigen Amplikons. Dies führte zur Freisetzung des interkalierten Fluoreszenzfarbstoffs und konnte gemessen werden. Die so ermittelte Schmelzkurve war charakteristisch für jedes PCR-Produkt und änderte sich z.B. in Abhängigkeit vom Guanin-Cytosin-Gehalt des Amplikons.

Ermittlung der Primer-Effizienz

Um die Effizienz der in der qPCR eingesetzten Primerpaare zu bestimmen, wurde eine qPCR mit einer cDNA-Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000) durchgeführt. Danach wurde der Ct-Wert logarithmisch gegen die cDNA-Konzentration aufgetragen, eine Regressionsgerade erstellt und deren Steigung ermittelt. Über folgende Formel wurde die Effizienz anhand der Steigung berechnet:

$$\text{Effizienz (\%)} = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}} * 100.$$

Die Effizienz sollte zwischen 90 % und 110 % liegen. Primer, die nicht diesem Kriterium entsprachen, wurden verworfen.

Jede Reaktion wurde in Triplikaten in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 10 µl. Die Platte wurde mit einer optischen Klebefolie verschlossen, die Platte kurz zentrifugiert, in das Quant-Studio 3 Realtime-Gerät überführt und der Lauf gestartet (Tab. 2.29, Tab. 2.30, Tab. 2.31).

Tab. 2.29: Pipettierschema des Mastermix

Inhalt	1x Ansatz [µl]	3,5x Ansatz [µl]
Primer for + rev 5 µM	0,5	1,75
SYBR green ®	5	17,5
nukleasefreies Wasser	3,5	12,25
dazu: cDNA-Verdünnung 1:4	1	3,5

Tab. 2.30: Pipettierschema der Primervalidierung mit Verdünnungsreihe

TAK1_E12			TAK1_E2			Wasserprobe
1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	
0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	TAK1_E12/E2
0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	TAK1_E12/E2

Tab. 2.31: Programm der qPCR

	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
<i>Hold stage</i>	1	50	120
	2	95	600
<i>PCR stage</i>	1	95	15
	2	60	60

Das Programm der Schmelzkurvenbestimmung lief folgendermaßen ab:

Schritt 1: 95 °C, Schritt 2: 60 °C, Schritt 3: 95 °C.

Auswertung

Nach Laufende erfolgte die Auswertung mit Hilfe der QuantStudio™ Design und Analysis Software v1.4. Um zu überprüfen, ob während der PCR wie gewünscht nur ein Amplikon entstanden war, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Zeigte die Schmelzkurve nur einen einzigen, schmalen Peak, konnte von nur einem spezifischen Amplikon ausgegangen werden. Primerdimere oder zusätzliche unspezifische Amplikons würden hingegen zu weiteren Peaks in der Schmelzkurve führen. Bei der qPCR wurden zuerst die Werte der mRNA zur besseren Vergleichbarkeit auf 18sRNA normalisiert. Der Ct-Wert der 18sRNA wurde zur Normalisierung vom gemessenen Wert subtrahiert und bildete den Exponenten zur Basis 2. Aus den Duplikaten wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet.

2.3.14 Semiquantitative PCR

Für die zur Isoformuntersuchung verwendete semiquantitative PCR wurden folgende Reagenzien pipettiert (Tab. 2.32) und folgendes PCR-Programm wurde verwendet (Tab. 2.33):

Tab. 2.32: Ansatz der semiquantitativen PCR

Inhalt	Menge [μ l]
Primer TAK1_ Exon 12 _for (10 μ M)	0,3
Primer TAK1_ Exon 12_ rev (10 μ M)	0,3
RedTaq	7,5
Wasser	5,9
DNA	1

Tab. 2.33: Protokoll für die semiquantitative PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Zyklen
Denaturierung	94	300	1
Denaturierung	94	30	34
Anlagerung	58	60	
Elongation	72	45	
Finale Elongation	72	5	1
Kühlen	4	∞	

Im Anschluss wurden die Proben mit einem 2%igen Agarosegel ohne Zugabe von Probenpuffer aufgetragen. Die Laufzeit betrug 4 h.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zelllinien und deren Kultivierung

Die Kultivierung von Zellkulturzellen wurde in sterilen Petrischalen bei 37 $^{\circ}$ C und 5 % CO₂-Gehalt durchgeführt. Dem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (ThermoFisher) wurden 50 ml nicht-hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) sowie 7 ml Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Für die Kultivierung in 10 cm-Schalen wurde 10 ml Medium verwendet, wovon in 12-Well-Platten 1 ml pro Well vorgelegt wurde. Die verwendeten humanen Zelllinien wuchsen adhärent. Während Huh7- und HEK293T-Zellen eine einlagige Zellschicht bildeten, kamen HepG2-Zellen auch als Multilayer vor. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.4.2 Expandieren von Zellen

Die unter dem Mikroskop beurteilten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 bis 80 % gesplittet. Dafür wurde unter der Sterilbank das Medium mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 2 bis 3 ml vorgewärmten calciumfreien PBS gewaschen. Durch die anschließende Zugabe von 1 ml Trypsin und die Inkubation der Platte für 3 bis 5 min bei 37 $^{\circ}$ C lösten sich die adhärennten Zellen von der Platte. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe warmen Mediums, dessen Menge dem Verdünnungsfaktor angepasst war, gestoppt und die noch anhaftenden Zellen mit dem Medium von der Platte gespült. Die Zellen wurden

vereinzelt und 1 ml der Suspension wurde in eine neue 10 cm-Schale überführt. Diese wurde in alle Richtungen geschwenkt und im Brutschrank weiter inkubiert.

2.4.3 Zellzahlbestimmung und Ausbringen von Zellen

Bestand bei Experimenten die Notwendigkeit, eine konstante Zellzahl auszubringen, wurde die Zellzahl pro Volumen vor dem Aussäen entweder manuell mit der Neubauer Zählkammer oder automatisch mit dem Casy Cell Counter zur Berechnung der erforderlichen Suspensionsmenge bestimmt. Bei Verwendung der Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der Zellsuspension luftblasenfrei zwischen Objektträger und Deckglas der Zählkammer pipettiert. Die Zählkammer weist ein Gitter mit vier großen Quadraten in allen vier Ecken auf. Die Zellzahl jedes dieser Quadrate wurde ohne Berücksichtigung der auf dem Gitter des Quadrates liegenden Zellen sowie der Zellaggregate bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl der Suspension erfolgte mit der Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert der Quadrate} * \text{Kammerfaktor} = \frac{\text{Zellzahl der Quadrate}}{4} * 10^4.$$

Zur Verdünnung wurde einem mit 10 ml Elektrolytlösung befüllten Gefäß 100 ml Zellsuspension zugegeben. Am Gerät wurde die Einstellung für die entsprechende Zelllinie ausgewählt, die Probe gemischt und in die Messkapillare eingetaucht. Nach der Dreifachmessung wurde der Mittelwert angegeben. Über die Gesamtzellzahl wurde die auszubringende Suspensionsmenge berechnet:

$$\text{Suspensionsmenge} = \frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{gezählte Zellzahl}}.$$

Die entsprechende Suspensionsmenge wurde spiralförmig zum vorgelegten Medium pipettiert, die Schale in alle Richtungen geschwenkt und im Brutschrank inkubiert.

2.4.4 Transiente Transfektion mit PEI-PBS

Durch Transfektion wurden die klonierten Überexpressionskonstrukte in humane Zellen eingebracht. Das kationische Polymer Polyethylenimin bindet die negativ geladene Plasmid-DNA und bildet Präzipitate, die von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden. Die Transfektion erfolgte ca. 24 h nach dem Ausbringen der Zellen. Entscheidender Faktor bei der Transfektion ist die Dichte der ausgebrachten Zellen. Ist diese zu hoch oder zu gering, so nimmt die Transfektionsrate rapide ab. Zur Transfektion von Zellen wurde calciumfreies PBS in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt, die entsprechende Menge DNA hinzupipettiert und durchmischt. Zu dem Gemisch wurde PEI-PBS gegeben, dreimalig hoch- und runterpipettiert, 5 s gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise in der Kulturschale verteilt, homogen geschwenkt und die Schalen im Brutschrank für 48 h inkubiert.

Tab. 2.34: Pipettierschema der PEI-Transfektion

Kulturgefäß	DNA [μg]	PBS [μl]	PEI-PBS [μl]
10 cm Schale	10	180	216
6 cm Schale	4	72	86,4
6-Well Platte	2	36	43,2
12-Well Platte	1	18	21,6

2.4.5 Migrationsassay

Mit Hilfe des Migrationsassays konnte die von den Zellen in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Strecke bestimmt werden. Dafür wurden $2,6 \cdot 10^6$ Zellen in einer 10 cm Schale mit einem Gesamtvolumen von 15 ml ausgebracht, die Zellen nach 24 h transfiziert und nach weiteren 24 h in Silikoneinsätze, die einen definierten zellfreien Spalt erzeugen, erneut ausgesät. Die Inserts wurden hierfür in 12-Well-Platten mit einer Pinzette angedrückt, die Zellen mit dem Casy Cell Counter gezählt und auf 35.000 Zellen/ml eingestellt. Der Assay wurde in Vierfachansätzen durchgeführt. 90 μl der Suspension wurde in jede Kammerhälfte des Inserts pipettiert, 1 ml Medium außen in das Well, danach wurden die Platten im Brutschrank inkubiert. 24 h später wurden die Inserts vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und der dadurch entstandene Spalt im Panoramamodus fotografiert (Software: Gryphax). Der Spalt wurde zu definierten Stunden (mind. nach 0 h, 14 h, 22,5 h) bis zum vollständigen Spaltschluss fotografiert.

Bei vollständig geschlossenem Spalt erfolgte die Auswertung mit der Software ImageJ unter Zuhilfenahme des Plugins „*Wound Healing tool*“: Die Analyse erfolgte mit folgenden Parametern: *method: variance, variance filter radius: 10, treshold: 40, radius open: 4, min. size: 10000*. Die aufgenommenen Bilder wurden geöffnet und mit dem Auswahlwerkzeug wurde ein Kasten definierter Länge (meist 7000 Pixel) erstellt, dabei nur der gerade Teil des Spalts erfasst und das Bild beschnitten (*crop*). Mit Hilfe des *Wound Healing Plugins* wurde die zellfreie Spaltfläche des Bildausschnitts für alle Messzeitpunkte bestimmt, woraus sich folgende mittlere Spaltbreite ergab:

Durch ImageJ bestimmte Fläche $A = \text{definierte Länge } b \cdot \text{mittlere Spaltbreite } a$, Umformung: $a = A/b$ (Abb. 2.5).

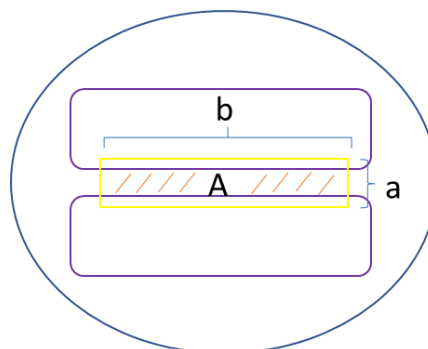


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Inserts inklusive der ermittelten Parameter.

Für die Bestimmung der migrierten Strecke der Zellen (in Pixel/h) wurden von der mittleren Spaltbreite zum Zeitpunkt t_0 (nach Entfernen des Inserts) die Werte t_1 (... h), t_2 (... h) usw. subtrahiert. Da die Zellen von beiden Rändern in den Spalt einwandern, wurde der ermittelte Wert durch 2 dividiert. In Excel wurden im Anschluss in einem Punkte-Diagramm die migrierte Strecke (in Pixel/h) gegen die Zeit (h) aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die Punkte gelegt. Mit Hilfe der Gleichung der Geraden wurde die zurückgelegte Strecke nach einer definierten Zeit, hier nach 14 h, ermittelt. Dies ermöglichte einen Vergleich der zurückgelegten Strecke zu einem bestimmten Zeitpunkt für die verschiedenen Ansätze. Zur Umrechnung der migrierten Strecke in $\mu\text{m/h}$ wurde mittels Maßstabsbalken bestimmt, wie viel Pixel einem μm entsprechen.

2.4.6 Proliferationsassay

Zur Ermittlung der Proliferationsrate der Zellen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 (Ser10) durchgeführt. Die Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 korreliert eng mit der Chromosomenkondensation während der Mitose. Der Proliferationsassay erfolgte parallel zu den Migrationsanalysen. Die unter Kap. 2.4.5 beschriebenen transfizierten Zellen wurden nicht nur zur Aussaat in die Migrations-Inserts verwendet, sondern auch für den Proliferationsassay. Hierfür wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 10 mm in 12-Well Platten gelegt, 1 ml Medium zugegeben und die Glasplättchen leicht angedrückt, um Luftblasen zu entfernen. Im Anschluss wurden 100.000 Zellen pro Well ausgebracht. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie (Kap. 2.2.5) weiter prozessiert.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Zellernte, Zellyse und Fraktionierung

Zellernte

Nach der Beurteilung der Zellvitalität unter dem Lichtmikroskop wurde das Kulturmedium mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1000 Upm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet entweder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren oder direkt der Zellaufschluss durchgeführt.

Zellyse/Zellaufschluss

Bei Zellkulturzellen wurde zur Herstellung von Gesamtzelllysaten die sedimentierten Zellen in ColP-Puffer + 1%-Triton X-100 + 1:100 Protease-/Phosphatase-Inhibitor resuspendiert. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss auf Eis mittels Sonicator für 10 s bei 100 % Leistung.

Nach Zentrifugation bei 13.000 Upm für 10 min wurde das Pellet verworfen und der Überstand mit den zu untersuchenden Proteinen in ein neues Eppendorftube überführt.

Bei kryokonservierten Geweben wurden Schnitte des Lebergewebes für die Fraktionierungsversuche mit Gewebe aus der Biobank angefertigt. Die entsprechenden Puffer wurden auf das gefrorene Gewebe gegeben.

Frischgewebe wurde vorher einem Kollagenaseverdau unterzogen. Dafür wurden 20 mg Collagenase IV (Sigma C5138) in 1 ml HBSS-Puffer gelöst. Für den Verdau-Puffer wurden davon 250 µl in 4750 µl PBS gegeben. Anschließend wurde das Gewebe ca. 10 min mit einem Skalpell in einer Petrischale zerkleinert und 5 ml Verdau-Puffer pro Gramm Gewebe hinzugefügt. Das Gemisch wurde in ein 15 ml Falcon transferiert und für mindestens 30 min bei 37 °C und 175 Upm inkubiert. Danach wurde der Verdau durch ein 100 µm Sieb gefiltert, mit PBS nachgespült, bei 1000 Upm für 2 min zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Herstellung von zytosolischen und nukleären Extrakten

Um zu überprüfen, ob ein Protein im Zellkern oder im Zytoplasma lokalisiert ist, wurde eine Fraktionierung in eine zytosolische und eine nukleäre Fraktion mittels Zweipuffersystem durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 400 µl kaltem Puffer A + 1:100 Protease-/Phosphatase-Inhibitor resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis schollen die Zellen an und lysierten osmotisch. Im Anschluss wurden 25 µl 10% NP40 für den Zellmembranaufschluss zugegeben, 10 s bei RT gründlich gemischt und 30 s bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen zytoplasmatischen Proteine enthielt, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die pelletierten Kerne wurden daraufhin in 50 µl kalten Puffer B + 1:100 Proteinase-/Phosphataseinhibitor resuspendiert und die Suspension nach der Sonifizierung auf Eis 10 min bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand war die Kernfraktion.

2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford diente der Ermittlung der Proteinkonzentration eines Zelllysats. Der Farbstoff Coomassie-Blau bildet mit Proteinen Komplexe, die eine detektierbare Verschiebung des Absorptionsmaximums bewirken (Bradford, 1976). Parallel zu den Proben unbekannter Konzentration wurde eine Eichreihe mit einer 1 mg/ml BSA-Lösung (10x) bekannter Konzentration erstellt. 0; 2,5; 5; 7,5; 10 und 15 µg/ml BSA bzw. 0,8 bis 3 µl der Proben unbekannter Konzentration wurden vorgelegt, 1 ml verdünntes Bradford-Reagenz (Coomassie Brilliant-Blue G250; 1:5 in Reinstwasser) hinzupipettiert, gründlich gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Ansatzes in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Absorption bei 595 nm mittels Spektralphotometer Tecan Spark photometrisch gemessen.

Die Absorption der Standardreihe wurde in Excel gegen die Konzentration in einem Punktediagramm aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die einzelnen Datenpunkte

gelegt. Von dieser wurde die Geradengleichung ausgegeben und zur Bestimmung der unbekanntenen Proteinkonzentration verwendet.

2.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-(Sodium-Dodecylsulfat-)Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und dabei nahezu unabhängig von der Eigenladung der Proteine (Shapiro *et al.*, 1967).

Gelherstellung

Die Acrylamidgele zur Gelelektrophorese bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel mit unterschiedlichem pH-Wert und unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen (Laemmli, 1970; Gallagher, 2006). Die Wahl der Prozentigkeit des Trenngels erfolgte in Abhängigkeit von der zu erwartenden Proteingröße. Hierzu wurden Reinstwasser, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 30 % Polyacrylamidmix und 10 % SDS zusammenpipettiert und die Polymerisation durch Zugabe von 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Katalysator gestartet. Nach dem gründlichen Mischen wurde der Ansatz zwischen zwei in einer Halterung eingespannten Glasplatten pipettiert. Während der Zeit der Polymerisation wurde der Ansatz zum Schutz vor Austrocknen und zur Oberflächenglättung mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde Isopropanol abgegossen, mit Wasser gespült und das restliche Wasser mit einem Filterpapier entfernt. Die Komponenten des Sammelgels wurden zusammen pipettiert, das Trenngel damit überschichtet und ein 10- oder 15-Well-Kamm eingesetzt (Tab. 2.35).

Tab. 2.35: Pipettierschema der Polyacrylamidgele unterschiedlicher Prozentigkeiten

Komponenten	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel
30 % Acrylamid Mix	1,7 ml	2 ml	0,33 ml
Tris-HCl	1,3 ml (1,5 M, pH 8,8)	1,3 ml (1,5 M, pH 8,8)	0,5 ml (0,5 M, pH 6,8)
Reinstwasser	2 ml	1,7 ml	1,15 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	20 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl

Beladung der SDS-Gele

Die Proteinlysate wurden mit ColP-Puffer mit 1 % Triton X-100 bzw. Puffer A und B auf ein gleiches Gesamtvolumen eingestellt und mit 6-fach SDS-Ladepuffer versetzt. Vor dem Laden erfolgte die Denaturierung der Proben für 10 min bei 95 °C auf dem Heizblock. Die Gele wurden in den Laufkammereinsatz eingespannt und die Kammer mit ca. 1,5 l SDS-Laufpuffer befüllt. Nach Entfernen der Käme wurden die entstandenen Taschen gespült und die Proben mit Gelladespitzen in die Taschen pipettiert. Die erste Tasche wurde mit jeweils 6 µl

Proteinmarker befüllt und gegebenenfalls leere Taschen mit 1-fach SDS-Ladepuffer aufgefüllt. Der Lauf wurde mit einer Spannung von 60 V gestartet und sobald die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte, auf 100 V erhöht.

2.5.4 Immunblot

Beim Immunblot (Western Blot) werden Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Trägermembran übertragen, wodurch die Proteine für weitere Verfahren zugänglich sind (Renart *et al.*, 1979). Auf eine Elektrodenplatte der Blotkassette wurden drei in Semidry-Blotpuffer (200 ml Methanol, 100 ml 10-fach Blotpuffer, 700 ml Reinstwasser) getränkte Filterpapiere gelegt, darauf die ebenfalls in Semidry-Blotpuffer getränkte Membran. Das auf der Membran platzierte Trenngel wurde unter Zuhilfenahme der Transferstapelwalze so ausgerollt, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Membran befanden. Ein Filterpapier wurde aufgelegt, erneut ausgerollt, zwei Filterpapiere aufgelegt, zweimal ausgerollt, überschüssige Flüssigkeit abpipettiert und zuletzt die Kassette mit der zweiten Elektrode verschlossen. Die Kassette wurde in die Apparatur eingesetzt und der Transfer gestartet. Durch das Anlegen einer senkrecht zum Gel gerichteten Spannung mit 1 A und 25 V für 30 min wurde ein elektrisches Feld erzeugt, in dem die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Kathode auf die Nitrocellulose-Membran wanderten. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurden die Membranen anschließend mit dem unspezifischen Proteinfarbstoff Ponceau S Rot reversibel angefärbt und mit TBST (TBS + 0,05 % Tween 20) anschließend wieder entfärbt. Der Größenmarker war auch ohne Färbung sichtbar.

2.5.5 Entwicklung

Die nach der Ponceau S-Färbung entfärbten Membranen wurden mit TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver bei 4 °C über Nacht auf einem Wippschüttler inkubiert, um noch freie Bindestellen zu blockieren. Der gegen das nachzuweisende Protein bzw. Antigen gerichtete Primärantikörper wurde in TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver verdünnt. Die Membran wurde in einem 50 ml Falcon-Gefäß aufgerollt, die Antikörperverdünnung hinzupipettiert und 1 h bei RT auf einem Rollschüttler inkubiert. Dreimaliges Waschen bei RT für 10 min mit TBST-Puffer entfernte unspezifisch gebundene Antikörper. Der mit dem Enzym HRP (Horse-Radish-Peroxidase) gekoppelte Sekundärantikörper war gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers der Wirtsspezies gerichtet. Er wurde in TBST + 5 % Milch 1:3.000 verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran 1 min in einer Lösung aus 10 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5), 50 µl Luminol, 25 µl Cumarinsäure und 4 µl H₂O₂ im Dunkeln inkubiert. Das am Sekundär-Antikörper gekoppelte Enzym katalysierte dabei in einer Chemolumineszenzreaktion (ECL) unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Das Lumineszenzsignal wurde mit dem Gerät Fusion Solo S mit dem Programm Evolution-Capt detektiert. Zu vergleichende Membranen wurden mit gleichen Einstellungen mit gleicher Belichtungsdauer aufgenommen.

Anschließend wurden die Membranen bei 4 °C in TBST aufbewahrt oder für das Entwickeln mit einem weiteren Antikörper gestrippt (s.u.).

Um auszuschließen, dass unterschiedliche optische Dichten auf unterschiedlichen Lademengen beruhen, wurde die Membran abschließend mit Aktin als Ladekontrolle entwickelt und die Signalstärken durch Quotientbildung des Wertes vom Zielprotein und von Aktin normalisiert (Kap. 2.5.6).

„Strippen“: Entfernung gebundener Antikörper von der Membran

Um eine Membran mit verschiedenen Antikörpern nacheinander entwickeln zu können, wurden die gebundenen Antikörper mit Hilfe spezieller Puffer im sauren pH-Bereich entfernt. Hierfür wurde die Membran 10 min in 10 ml Stripping Puffer 1 (200 mM Glycin, 500 mM NaCl, pH 2,8), 10 min in 10 ml Stripping Puffer 2 (200 mM Glycin, 500 mM NaCl, pH 2,2) und anschließend 10 min in 10 ml TBST auf dem Wippschüttler bei RT inkubiert.

2.5.6 Densitometrische Auswertung

Eine semiquantitative densitometrische Auswertung mit ImageJ diente dem Vergleich der Proteinmengen und wurde mit der jeweiligen Aktin-Ladekontrolle verrechnet. Ein Rechteck definierter Größe wurde um die Proteinbanden gelegt, der mittlere Schwarzwert bestimmt und die Differenz zwischen diesem Wert und dem Hintergrund gebildet. Dadurch wurde der Faktor bestimmt, um welchen das Protein im HCC gegenüber dem nicht-neoplastischen Lebergewebe exprimiert wurde. Weiterhin wurde aus dem Quotienten des Marker- und Aktin-Wertes für die Bestimmung des Induktionsfaktors im HCC gegenüber dem nicht-neoplastischen Lebergewebe noch das Verhältnis im HCC versus Lebergewebe bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von TAK1 in HCC-Primarien und -Metastasen

3.1.1 TAK1 in humanem Lebergewebe

Die Rolle von TAK1 im HCC wurde bisher vorwiegend im Mausmodell untersucht (Roh *et al.*, 2014). Zur Expression von TAK1 in menschlichem HCC-Gewebe gab es zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit keine Daten. Die Ergebnisse der Mausstudien erscheinen teilweise widersprüchlich, da sowohl die Deletion als auch die Überexpression von TAK1 Steatohepatitis und HCC-Entstehung induzierten (Roh *et al.*, 2014).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, die Expression von TAK1 *in situ* in einem großen Kollektiv mit 871 HCCs von 561 Patienten zu untersuchen. Der mit diesen Proben erstellte TMA wurde immunhistochemisch analysiert und die Expression von TAK1 im HCC und im zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe semiquantitativ untersucht. Die Daten wurden mit dem Patientenüberleben und weiteren prognostischen und klinisch-pathologischen Parametern korreliert, um herauszufinden, ob TAK1 von klinischer und prognostischer Relevanz ist.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des TMAs erfolgte sowohl digital mit der quantitativen Bildanalysesoftware HALO von Indica Labs als auch durch manuelle Auswertung und ergab jeweils vergleichbare Ergebnisse. Bei manueller Auswertung konnte lediglich besser zwischen zytoplasmatischer und nukleärer TAK1-Färbung differenziert werden. Insgesamt wurde bei 14 % der HCCs keine nukleäre TAK1-Färbung (IRS = 0) detektiert. 58,7 % der HCCs zeigten eine schwache (IRS = 1 bis 4), 16,7 % eine mäßige (IRS = 5 bis 8) und 10,6 % eine starke Färbung (IRS = 9 bis 12; Abb. 3.1 a). TAK1 war überwiegend im Zellkern lokalisiert (Kap. 3.6) und wurde im HCC gegenüber dem umliegenden, nicht-neoplastischen, meist zirrhotisch umgebauten Lebergewebe hoch signifikant induziert, was sowohl für HCC-Primärtumore ($p = 7,96e^{-23}$) als auch für HCC-Rezidive ($p = 0,000253$) zutraf (Abb. 3.1 b). Interessanterweise ging eine hohe TAK1-Expression im Tumor auch mit einer hohen Expression im zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe einher (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $R = 0,6$; $p < 2,2e^{-16}$; Abb. 3.1 c).

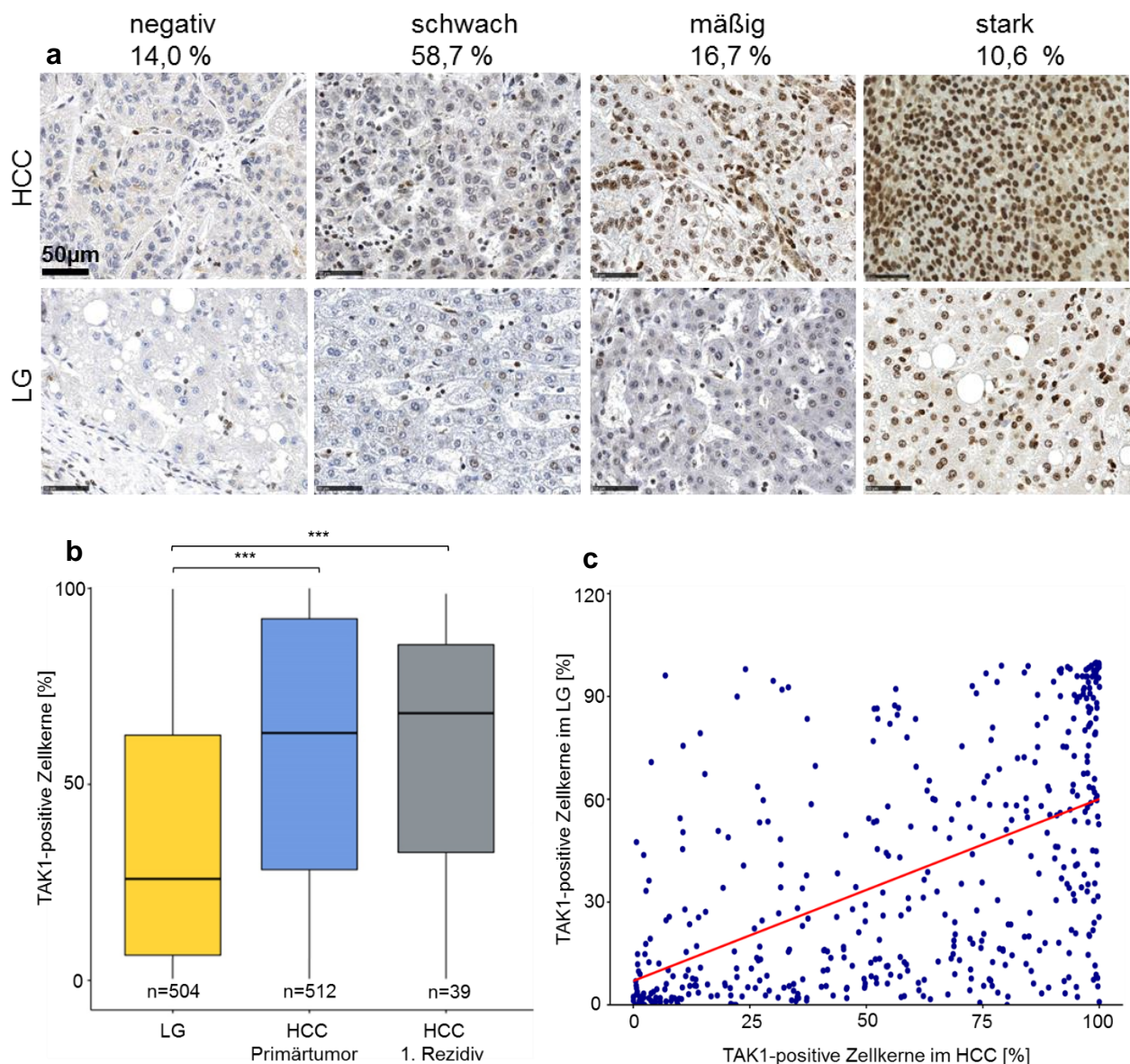


Abb. 3.1: Induktion von TAK1 im HCC. a) TAK1-Immunhistochemie in einem TMA mit humanen HCC- und zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebeproben. Gezeigt sind repräsentative Bilder der unterschiedlichen TAK1-Färbeintensitäten (negativ, schwach, mäßig und stark) sowie der Prozentsatz der identifizierten Tumore mit der jeweiligen Färbeintensität (oberste Zeile). b) Quantitative Analyse der TAK1-Expression (prozentualer Anteil der TAK1-positiven Zellkerne) im HCC-Primärtumor (n = 512) bzw. Rezidiv (n = 39) gegenüber dem zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe (n = 504); $p \leq 0,001 = ***$. Dargestellt sind die Mittelwerte, Kruskal-Wallis-Test. c) Streudiagramm der nukleären TAK1-Expression im HCC (x-Achse) und LG (y-Achse) (Spearman $R = 0,6$). Abk.: HCC = Hepatozelluläres Karzinom, LG = zugehöriges, nicht-neoplastisches Lebergewebe.

3.1.2 TAK1 in HCC-Metastasen

Von einigen Patienten lagen neben Leberresektaten des HCC-Primarius auch Lymphknotendissektionen und Resektionen von Fernmetastasen vor. Hier fiel eine signifikante Induktion der TAK1-Expression in den HCC-Fernmetastasen gegenüber dem primären HCC auf ($p = 0,042$). In Lymphknotenmetastasen wurde ein Trend in Richtung einer erhöhten TAK1-Expression gesehen, der allerdings nicht signifikant war ($p = 0,33$; Abb. 3.2 a, b).

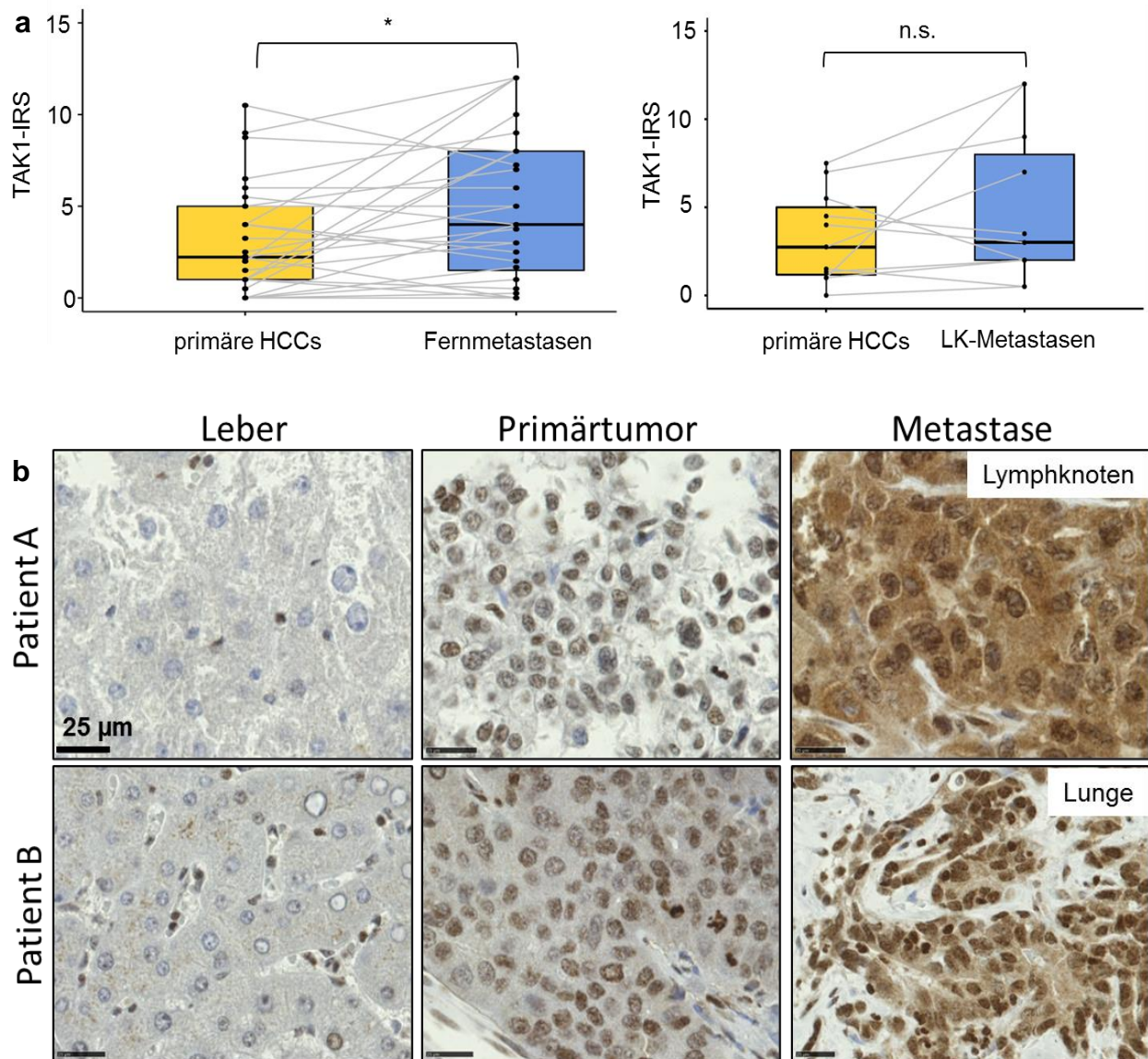


Abb. 3.2: TAK1-Induktion in HCC-Metastasen. a) Quantitative Analyse der TAK1-Expression im primären HCC verglichen mit Fernmetastasen ($n = 28$) und Lymphknotenmetastasen (LK-Metastasen) ($n = 11$), $p \leq 0,05 = *$. Gepaarter Wilcoxon-Test. b) Exemplarische Aufnahmen nach immunhistochemischer Färbung von TAK1 von Proben zweier Patienten: Leber und HCC-Primärtumor jeweils im Vergleich zur Lymphknotenmetastase (Patient A) bzw. zur Lungenmetastase (Patient B).

3.1.3 TAK1-Proteinexpression in HCC und Lebergewebe

Die immunhistochemischen TAK1-Analysen zeigten eine Induktion der TAK1-Expression im HCC gegenüber dem zugehörigen Lebergewebe (Kap. 3.1.1). Um die Induktion der TAK1-Expression auf Proteinebene zu untersuchen und die Spezifität des TAK1-Antikörpers zu validieren, wurden Immunblotanalysen von einem Kollektiv aus 14 HCC-Proben inklusive dem jeweils zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe durchgeführt (Kap. 7.2).

Die durchgeführten Immunblot-Analysen zeigten in 13 von 14 Fällen für TAK1 bei ca. 70 kDa eine stärkere Bande im HCC verglichen mit dem nicht-neoplastischen Lebergewebe. Die Aktin-Banden wiesen bei ca. 40 kDa bis auf wenige Proben eine ähnliche Intensität auf, so

Ergebnisse

dass von vergleichbaren Proteinmengen zwischen den Proben ausgegangen werden konnte (Abb. 3.3 a). Die densitometrische Quantifizierung der Bandenintensität von TAK1 unter Normalisierung mit der Ladekontrolle Aktin zeigte eine signifikante Induktion ($p = 0,0329$) von TAK1 im HCC gegenüber dem zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe (Abb. 3.3 b).

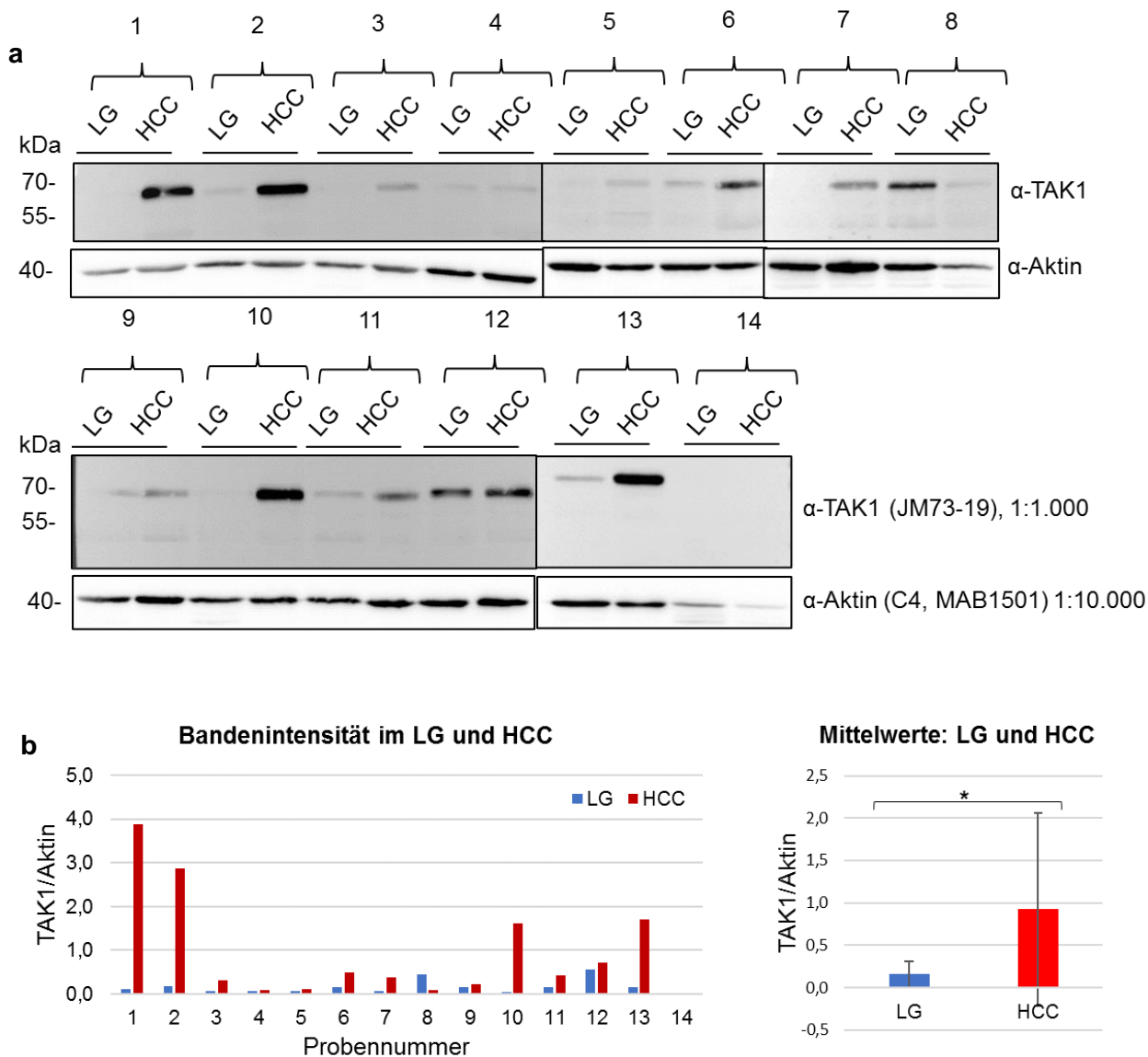


Abb. 3.3: Vergleich der TAK1-Expression zwischen HCC und zugehörigem, nicht-neoplastischem Lebergewebe auf Proteinebene. a) Immunblot von 14 Proben LG und HCC mit einem Antikörper gegen TAK1. Aktin diente als Ladekontrolle. 30 µg Protein eines Gesamtzelllysats von LG und HCC wurde alternierend geladen. Größenmarker in kDa auf der linken Seite. b) Densitometrische Auswertung der Banden des Immunblots aus (a). Links: Balkendiagramm der einzelnen ermittelten Bandenintensitäten im LG (blau) und HCC (rot) nach Normalisierung auf Aktin mittels densitometrischer Auswertung. Rechts: Mittelwerte und Standardabweichung der ermittelten Bandenintensitäten im LG (blau) und HCC (rot) nach Normalisierung auf Aktin mittels densitometrischer Auswertung. Gepaarter t-Test, $p = 0,0329$.

3.2 Untersuchung der TAK1-Isoformen

In der Literatur sind bislang vier unterschiedliche Transkripte von TAK1 bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen und Proteine kodieren, die sich in ihrer Funktion teils deutlich unterscheiden (Tripathi *et al.*, 2019). Daher sollten die beiden am besten charakterisierten Isoformen, nämlich das TAK1-Protein in voller Länge (TAK1FL) und TAK1 Δ E12, eine Speißvariante, der das C-terminale Exon 12 fehlt, auf RNA- und Proteinebene in humanem HCC und nicht-neoplastischem Lebergewebe vergleichend betrachtet werden.

3.2.1 TAK1-Isoformen im Immunblot

Um zu untersuchen, welche der oben genannten Isoformen im nicht-neoplastischem Lebergewebe bzw. im HCC exprimiert werden, wurden Immunblot-Analysen mit einem TAK1-Antikörper durchgeführt, der beide Isoformen detektiert (Firma Novusbio). Nach 4,5-stündiger Laufzeit bei 60 V und unter Verwendung von Gelen unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration konnte jedoch keine Auftrennung in die beiden Isoformen festgestellt werden, sondern nur eine einzelne Bande für TAK1 nachgewiesen werden (Abb. 3.3 a).

3.2.2 TAK1-Isoformen in semiquantitativer PCR-Analyse

Um die Expression der unterschiedlichen TAK1-Isoformen auf mRNA-Ebene weiter zu untersuchen, wurde eine semiquantitative PCR mit Isoform-spezifischen Primern gegen das variable Exon 12 und das konstante Exon 2 durchgeführt.

Laut Tripathi und Kollegen ist das TAK1FL-Transkript bei 606 bp zu erwarten, das TAK1 Δ E12-Transkript bei 579 bp (Tripathi *et al.*, 2019).

In den HCCs war außer bei den Proben 5, 7 und 13 sowohl auf Höhe von 620 bp, entsprechend TAK1 Δ E12, als auch 700 bp, entsprechend TAK1FL, jeweils ein PCR-Produkt sichtbar. Die Banden waren in ihrer Intensität nahezu gleich. Ausgenommen Probe 1 war bei den zugehörigen Lebergewebe-Proben dagegen nur die Bande von TAK1 Δ E12 auf Höhe von ca. 620 bp zu erkennen, auf der die TAK1-Variante mit herausgespleißten Exon 12 zu erwarten ist (Abb. 3.4).

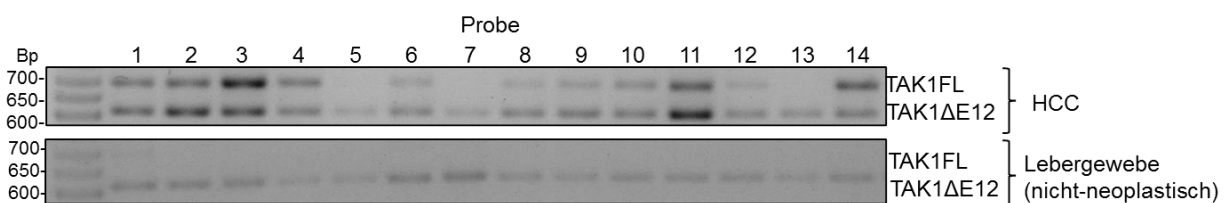


Abb. 3.4: Semiquantitative Expressionsanalyse von TAK1FL und TAK1 Δ E12 in humanen HCCs und respektiven Lebergeweben. 2%iges Agarosegel: PCR-Produkte unter Verwendung eines Exon 12-spezifischen-Primerpaares, 4-stündige Gel-Laufzeit (Primer aus Tripathi *et al.*, 2019), TAK1 Δ E12 auf Höhe von ca. 620 bp, TAK1FL bei ca. 700 bp, Größenmarker in bp auf der linken Seite. Abk.: bp = Basenpaare.

3.2.3 TAK1-Isoformen in der qPCR-Analyse

Neben der semiquantitativen Analyse der Expression der beiden Isoformen wurde zusätzlich eine quantitative Expressionsanalyse mittels Real-Time-PCR unter der Verwendung von Isoform-spezifischen Primern durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Verhältnis der TAK1-Expression zwischen HCC und Lebergewebe sowohl für die Expression von Exon 2 als auch für die Expression von Exon 12 ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert mit den Standardabweichungen der Verhältnisse von Exon 2 zu Exon 12 über alle Proben. Das Verhältnis zwischen Exon 2 zu Exon 12 insgesamt veränderte sich nicht, sondern blieb im Mittel stabil (Abb. 3.5 a). Eine signifikante Induktion von TAK1 im HCC konnte in der qPCR bestätigt werden. Bei Betrachtung des Vorkommens von Exon 2 gegenüber Exon 12 im HCC und umliegenden Lebergewebe zeigte sich eine 6-fach höhere Expression von Exon 2 im Vergleich zu Exon 12. Dies wird auch bei Analyse aller Proben sichtbar und das konstante Exon 2 war signifikant häufiger vorhanden als das variable Exon 12 (Abb. 3.5 b).

Zusammenfassend konnte eine Induktion von TAK1 im HCC auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Hierbei lag im Lebergewebe und auch im HCC vorwiegend die kurze Variante (TAK1 Δ E12) vor. Das Verhältnis der beiden Isoformen zueinander war im HCC im Vergleich zum angrenzenden Lebergewebe nicht signifikant verändert.

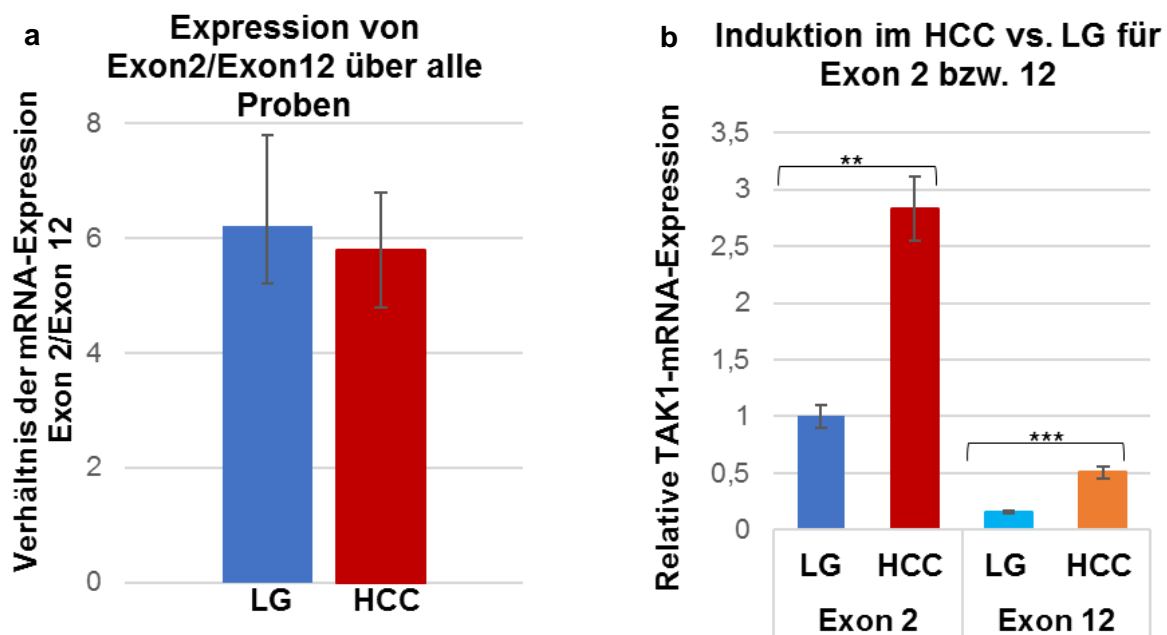


Abb. 3.5: Quantitative Real-Time PCR von TAK1 - Exon 2 und Exon 12 - im HCC und nicht-neoplastischen Lebergewebe. a) Verhältnis von Exon 2 zu Exon 12 als Mittelwert und Standardabweichung über alle Proben: Ähnliches Verhältnis von Exon 2 zu Exon 12 im HCC und zugehörigen Lebergewebe (LG), Mann-Whitney-U-Test. b) Signifikante Induktion von TAK1 im HCC auf mRNA-Ebene. Bei Analyse der Mittelwerte der relativen Expression zeigt sich die kurze Isoform ohne Exon 12 als dominierende Isoform von TAK1 im HCC und Lebergewebe auf mRNA-Ebene. t-Test, **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

3.2.4 Kontrolle von TAK1-Überexpressionskonstrukten in Zellkultur

Um die Funktion der beiden in der Literatur bislang am besten charakterisierten Isoformen TAK1FL und TAK1 Δ E12 in humanen Leberkrebszelllinien weiter zu untersuchen, wurden eukaryotische Überexpressionsvektoren kloniert. Humane cDNA diente bei der PCR-Amplifikation beider Isoformen als Matrize. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte in pJET subkloniert und terminal in die eukaryotischen Expressionsvektoren pcDNA3 mit oder ohne C-terminalen FLAG-*tag* inseriert. Zur Überprüfung der Funktionalität der klonierten Konstrukte wurden HEK293T- und Huh7-Zellen transfiziert und Proteinlysate der Zellen mittels Immunblot analysiert. Die Lysate wurden sowohl mit einem TAK1-spezifischen Antikörper als auch mit einem Antikörper gegen den FLAG-*tag* analysiert.

Die Überexpression von FLAG-TAK1 Δ E12 und TAK1FL führte zur Detektion von Banden bei ca. 70 kDa sowohl in den Huh7- als auch in den HEK293T-Zellen, wobei FLAG-TAK1FL erwartungsgemäß ein größeres Molekulargewicht zeigte. Bei ca. 60 kDa waren ebenfalls Signale unterschiedlicher Proteinmasse erkennbar, bei denen es sich offenbar um Abbauprodukte handelt. Die Detektion des Immunblots mit dem TAK1-Antikörper zeigten sowohl in den Huh7- als auch in den HEK293T-Zellen für TAK1 Δ E12 und TAK1FL jeweils zwei Banden bei ca. 70 kDa und leicht darüber, so dass ein Unterschied im Molekulargewicht von 3 kDa (27 Aminosäuren) zwischen der kurzen und der langen Isoform detektiert werden konnte. Die C-terminale FLAG-Markierung behinderte offenbar die Detektion durch den TAK1-Antikörper, dessen Epitop nahe dem C-Terminus gelegen ist. Die Detektion mit Aktin ergab eine annähernd gleiche Signalintensität in allen 5 Spuren (Abb. 3.6 a, b).

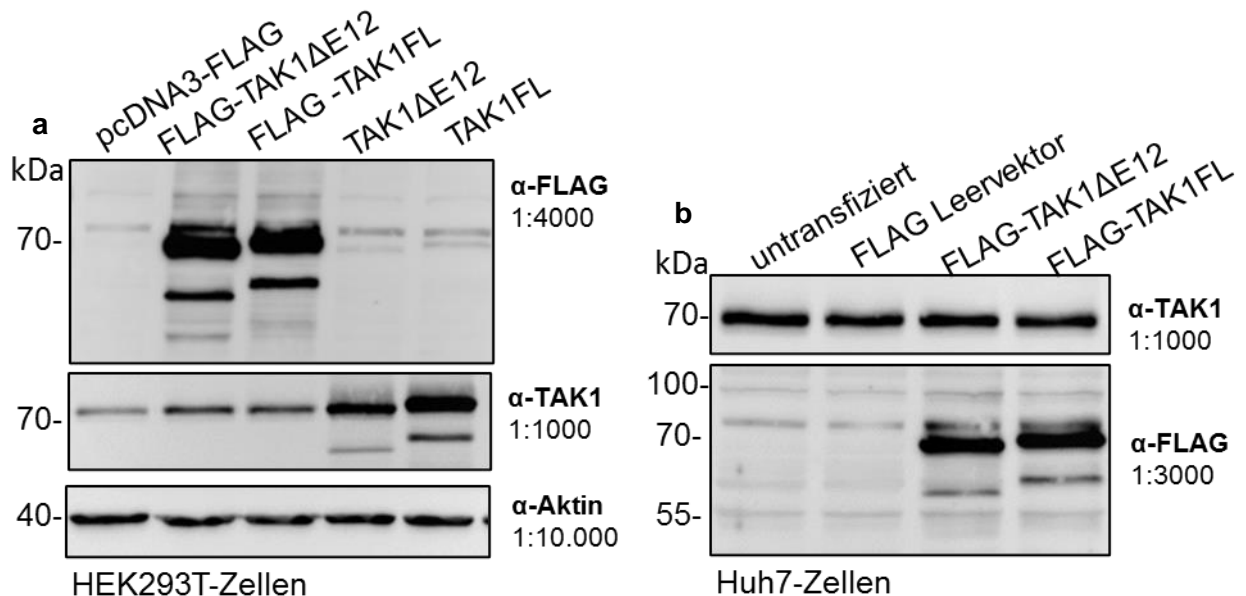


Abb. 3.6: Immunblot von HEK293T- und Huh7-Gesamtzelllysaten zur Kontrolle von Transfektionskonstrukten. a) HEK293T-Zellen nach Transfektion mit 10 μ g Plasmid-DNA (25 μ g Proteinlysat), Ladekontrolle mit Aktin. Überexpression der beiden Isoformen mit und ohne FLAG-Markierung. b) Huh7-Zellen nach Transfektion mit 10 μ g Plasmid-DNA (25 μ g Proteinlysat). Überexpression der beiden Isoformen mit FLAG-Markierung. Jeweils 10%ige Gele. Größenmarker in kDa.

Durch Immunfluoreszenzmikroskopie konnten die Überexpressionskonstrukte mittels FLAG-Markierung in Huh7-Zellen identifiziert werden (Abb. 3.7). Hier lokalisierte TAK1 eher perinukleär. Auch hier schien die C-terminale FLAG-Markierung die Detektion durch den TAK1-Antikörper zu behindern, so dass stattdessen die Detektion mit dem FLAG-Antikörper durchgeführt wurde.

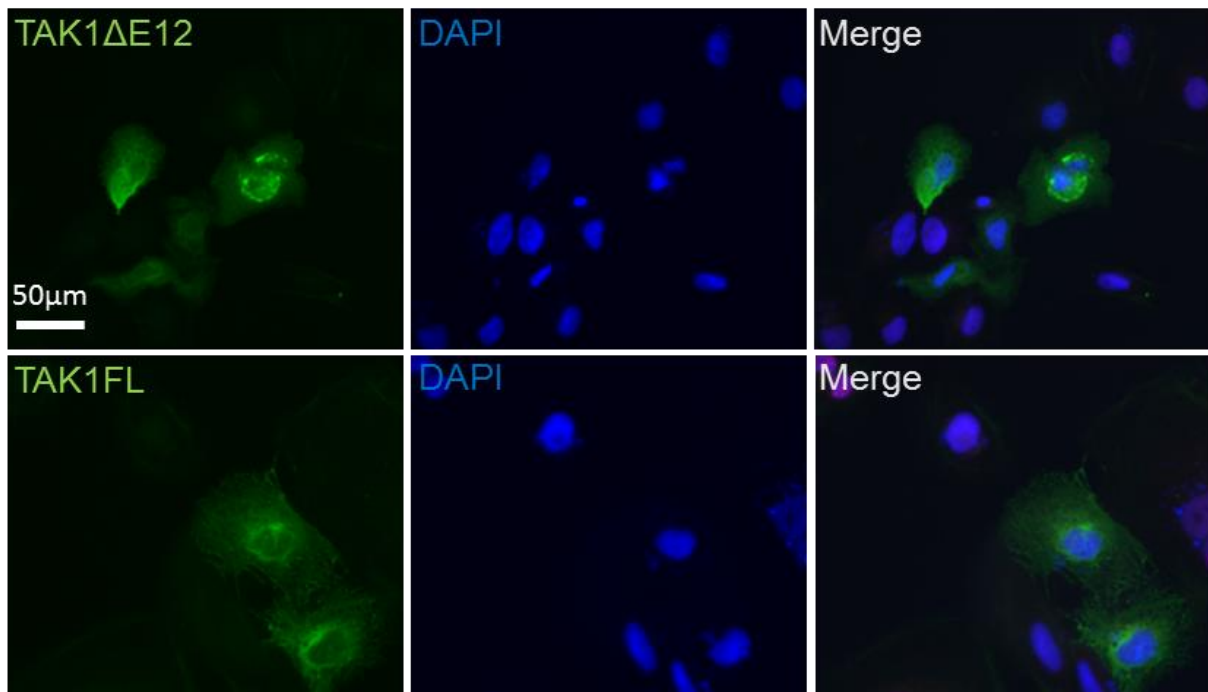


Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopie der TAK1-Überexpressionskonstrukte in Huh7-Zellen. Fluoreszenzmikroskopie von Huh7-Zellen nach Überexpression von FLAG-TAK1 Δ E12 und FLAG-TAK1FL (Antikörper gegen FLAG-tag, DAPI zur Darstellung der Zellkerne). Maßstabsbalken: 50 μ m.

3.3 TAK1 Δ E12-vermittelte Induktion der Zellmigration

Bei Analyse der TAK1-Expression in humanen HCCs war eine Induktion in HCC-Metastasen gegenüber den HCC-Primären nachweisbar, wie bereits zuvor gezeigt wurde (Kap. 3.1.2). Dies lässt u.a. einen möglichen Einfluss von TAK1 auf das Migrationsverhalten von Zellen vermuten (Entschladen *et al.*, 2004), der anhand von Migrationsassays mit Huh7-Zellen weiter untersucht werden sollte. Nach Durchführung des Assays wurde die genauere Effizienzbestimmung über die Immunfluoreszenzfärbung im Zusammenhang mit der Bestimmung der Proliferationsrate durchgeführt. Die Auswertung zu verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass sich der Spalt bei den mit den unterschiedlichen TAK1-Konstrukten transfizierten Zellen schneller schloss als bei den mit dem Leervektor transfizierten Zellen, so dass sie in der gleichen Zeit eine größere Distanz zurückgelegt haben. Die Variante FLAG-TAK1 Δ E12 führte dabei zu einer signifikanten Zunahme der Migrationsaktivität. Die Migrationsaktivität der mit FLAG-TAK1FL transfizierten Zellen erhöhte sich dagegen weniger stark gegenüber dem Leervektor (Abb. 3.8 a, b). Die mit dem Leervektor transfizierten Zellen

fürten nach 14 h zu einem durchschnittlichen Spaltschluss um 74 μm , die mit FLAG-TAK1 ΔE12 transfizierten Zellen um 92 μm und die mit FLAG-TAK1FL transfizierten Zellen um 78 μm .

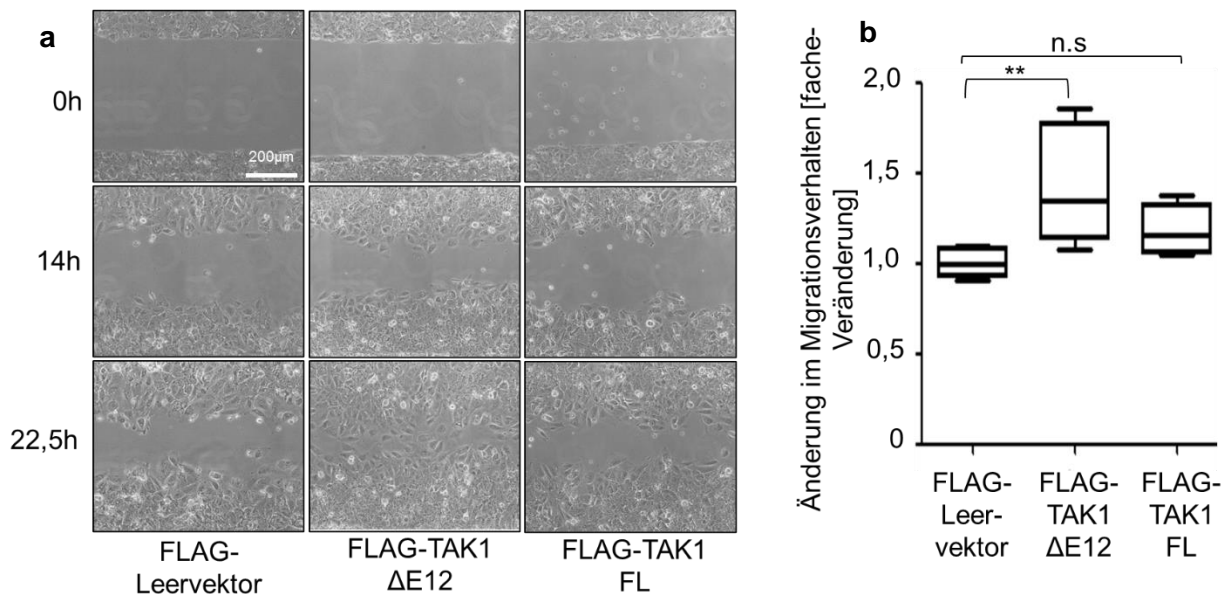


Abb. 3.8: Einfluss von TAK1 auf das Migrationsverhalten von Huh7-Zellen. a) Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des Migrationsversuchs von mit FLAG-Leervektor, FLAG-TAK1 ΔE12 oder FLAG-TAK1FL transfizierten Huh7-Zellen 0, 14 und 22,5 h nach Entfernung des Inserts. b) Induktion der Migrationsaktivität durch Transfektion mit den TAK1-Überexpressionskonstrukten. Statistische Auswertung mit dem Kruskal-Wallis-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die Werte wurden auf den Mittelwert des Leervektors normalisiert. Über die Fläche wurde die mittlere Spaltbreite bestimmt und anschließend der Spaltschluss (in Pixel/h) gegen die Zeit (h) aufgetragen. Die Gleichung der Geraden wurde verwendet, um die zurückgelegte Strecke nach einer definierten Zeit zu ermitteln.

3.4 Einfluss von TAK1 auf Apoptose und Proliferation

TAK1 wird in der Literatur als antiapoptotisch und proproliferativ beschrieben (Mukhopadhyay und Lee, 2020). Deswegen wurde eine Korrelation der TAK1-Expression mit Apoptose und Proliferation mittels Immunhistochemie untersucht. Entgegen der Erwartung zeigten HCCs mit hoher TAK1-Expression eine stärkere Immunreaktivität für gespaltene Caspase 3 als Marker für Apoptose als solche mit niedriger TAK1-Expression (Abb. 3.9 a). In HCCs mit hoher TAK1-Expression wurde eine signifikant erhöhte Ki67-Proliferationsrate gegenüber HCCs mit niedriger TAK1-Expression nachgewiesen (Abb. 3.9 b).

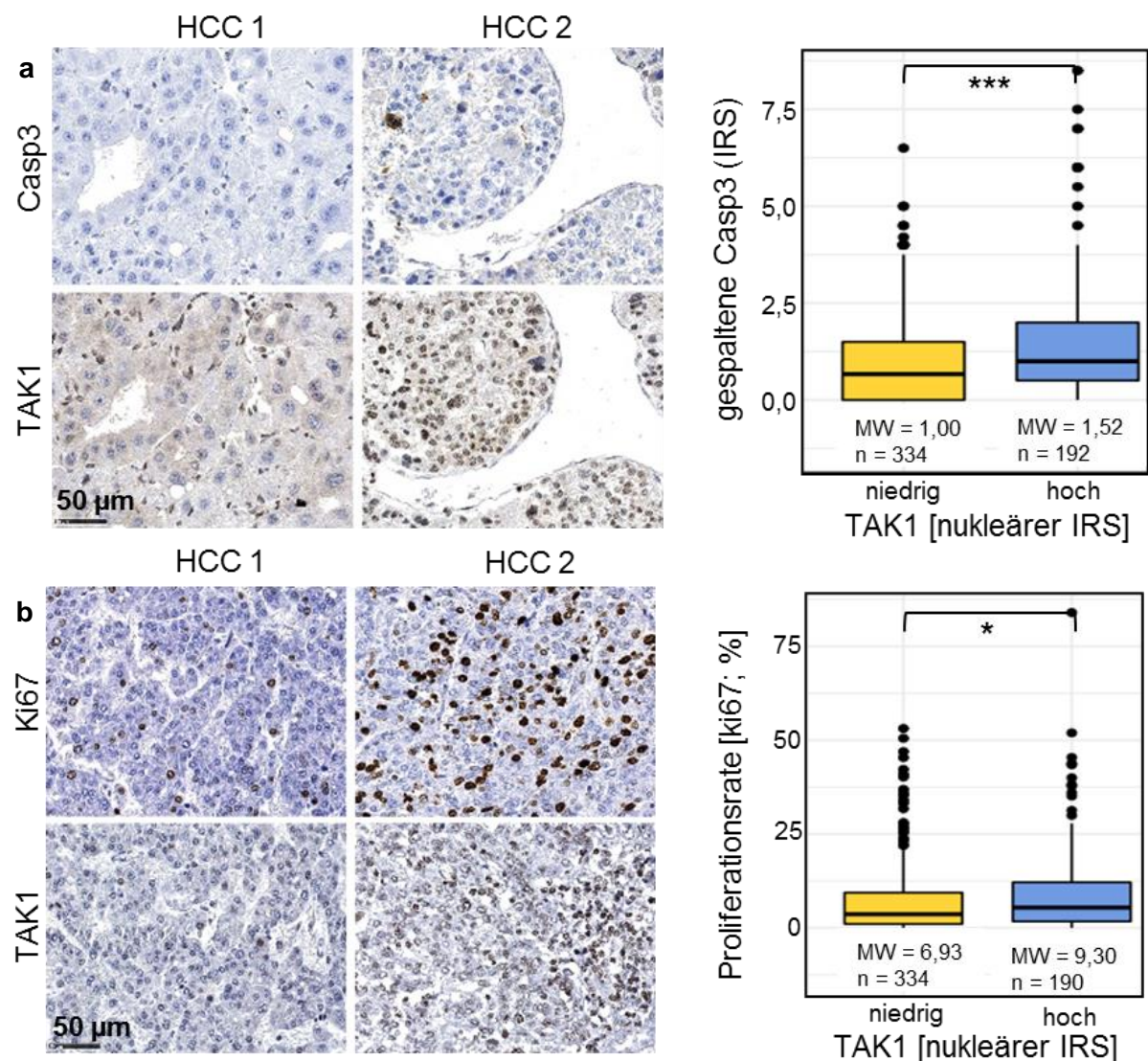


Abb. 3.9: Einfluss der TAK1-Expression auf Apoptose und Proliferation im HCC *in situ*.

a) und b) Assoziation von TAK1 und Casp3 bzw. Ki67. Links: Repräsentative Aufnahmen nach immunhistochemischer Färbung für die angezeigten Proteine in Bezug auf niedrige und hohe TAK1-Färbung. Rechts: Quantifizierung der Immunreaktivität von Casp3 ($p \leq 0,001$) bzw. Ki67 ($p \leq 0,01$) in Bezug auf niedrige und hohe TAK1-Expression. Mann-Whitney-U-Test. Abk. IRS = Immunreaktiver Score.

Nach Durchführung der *in vivo*-Analyse wurden Huh7-Zellen mit Überexpressionskonstrukten transfiziert und der Einfluss von TAK1 auf die Proliferation *in vitro* untersucht (Abb. 3.10 a). Die durchschnittliche Transfektionseffizienz lag für FLAG-TAK1 Δ E12 bei ca. 10,29 %, für FLAG-TAK1FL bei 9,39 %. Die durch Färbung gegen phospho-Histon H3 ermittelte Proliferationsrate betrug in den untransfizierten Zellen im Mittel 1,67 %, nach Transfektion mit dem FLAG-Leervektor 1,92 %, mit FLAG-TAK1 Δ E12 1,91 % und mit FLAG-TAK1FL 1,87 %. Der Mittelwert doppelt positiver Zellen betrug 0,35 % bei FLAG-TAK1 Δ E12 und 0,33 % bei FLAG-TAK1FL. Eine signifikante Induktion der Proliferationsaktivität durch TAK1 wurde hier nicht beobachtet (Abb. 3.10 b)

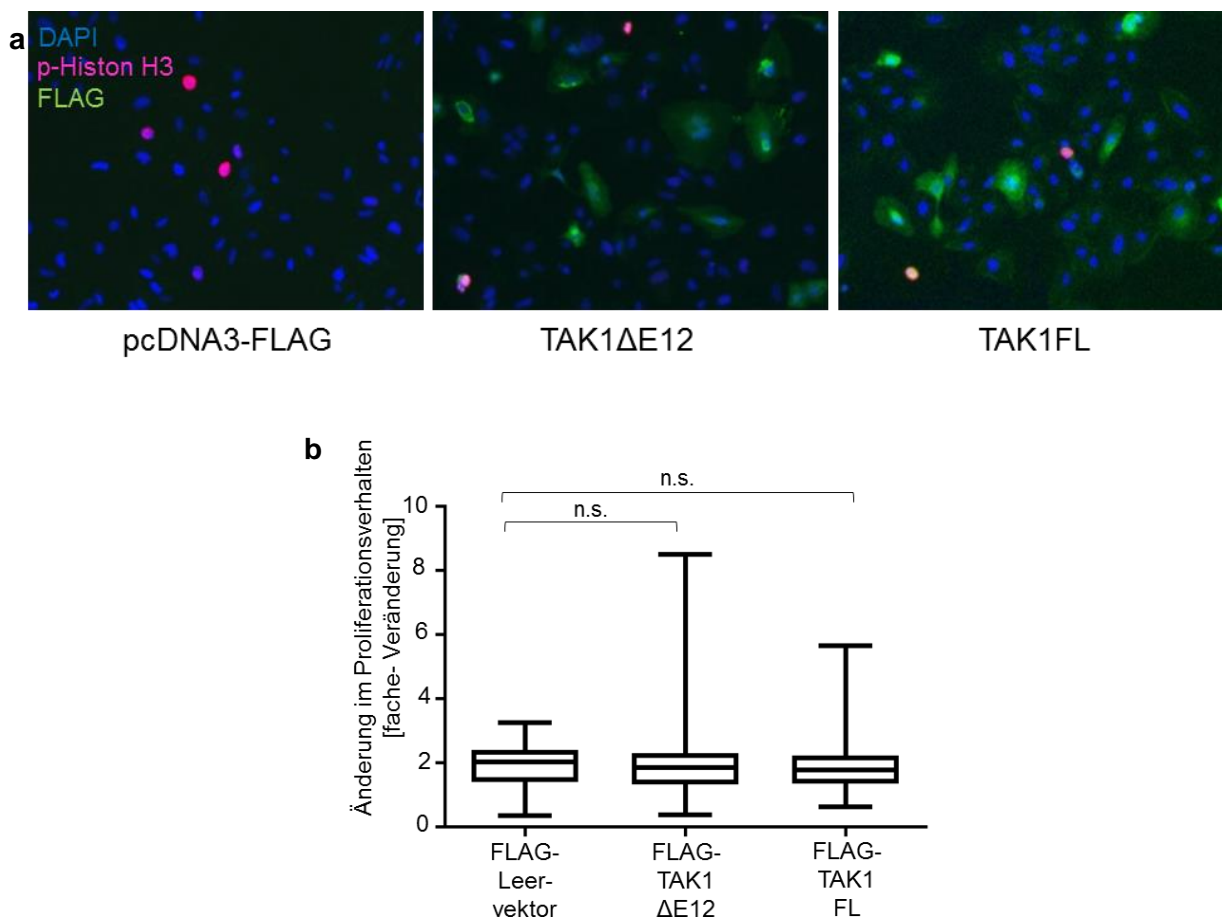


Abb. 3.10: Einfluss von TAK1 auf die Proliferation in HCC-Zellen *in vitro*. a) Immunfluoreszenzmikroskopie eines exemplarischen Bildausschnitts: blau: DAPI (Zellkerne), grün: FLAG, rot: Phosphohiston H3 (PH3); Doppelfärbung. Für die Auswertung wurde die Gesamtzellzahl mittels DAPI bestimmt. Grün fluoreszierende FLAG-getaggte Zellen, rot fluoreszierende Phosphohiston H3-positive Zellen sowie doppelt positive Zellen wurden gezählt. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde der Quotient aus PH3-positiven Zellen und der Gesamtzellzahl gebildet. b) Quantifizierung der Induktion der Proliferationsaktivität der mit FLAG-Leervektor, FLAG-TAK1ΔE12 bzw. FLAG-TAK1FL transfizierten Zellen nach Auswertung mit dem Kruskal-Wallis-Test, Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Klinisch-prognostische Wertigkeit der TAK1-Expression im HCC

3.5.1 Assoziation der TAK1-Expression mit dem Gesamtüberleben

In den vorherigen Untersuchungen zeigte sich eine Deregulation von TAK1 im HCC. Um eine Aussage über die Eignung von TAK1 als prognostischen Marker treffen zu können, wurde die TAK1-Expression mittels Immunhistochemie durch Bestimmung des IRS im TMA semiquantitativ analysiert und mit dem Patientenüberleben korreliert. Patienten mit einer hohen nukleären TAK1-Expression (IRS > 3,58) verstarben früher als Patienten mit niedrigerer TAK1-Expression. Die Überlebenszeiten beider Gruppen unterschieden sich signifikant ($p = 0,011$, Log-rank-Test; Abb. 3.11 a). Die *Hazard Ratio* (HR) ergab ein um 1,34 (Konfidenzintervall (KI) 1,07 bis 1,69) höheres Sterberisiko der Gruppe mit hoher TAK1-Expression gegenüber der Gruppe mit niedriger Expression. Zum Vergleich wurde auch der

Ergebnisse

öffentlich verfügbare Datensatz der TCGA-Kohorte analysiert (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017), bei dem die mRNA-Expression von TAK1 mit dem Patientenüberleben korreliert wurde. Auch hier zeigte sich bei hoher TAK1-Expression eine geringere Überlebensrate ($p = 0,0003$, Log-rank-Test; Abb. 3.11 b).

Interessanterweise war eine hohe Expression von TAK1 in Zellkernen sowie im Zytoplasma des nicht-neoplastischen Lebergewebes mit einem kürzeren Patientenüberleben assoziiert ($p = 0,0023$ bzw. $p = 0,00095$, Log-rank-Test, Kap. 7.3). Im HCC hatte die zytoplasmatische TAK1-Expression keinen signifikanten Effekt auf das Patientenüberleben ($p = 0,28$, Log-rank-Test, Kap. 7.3).

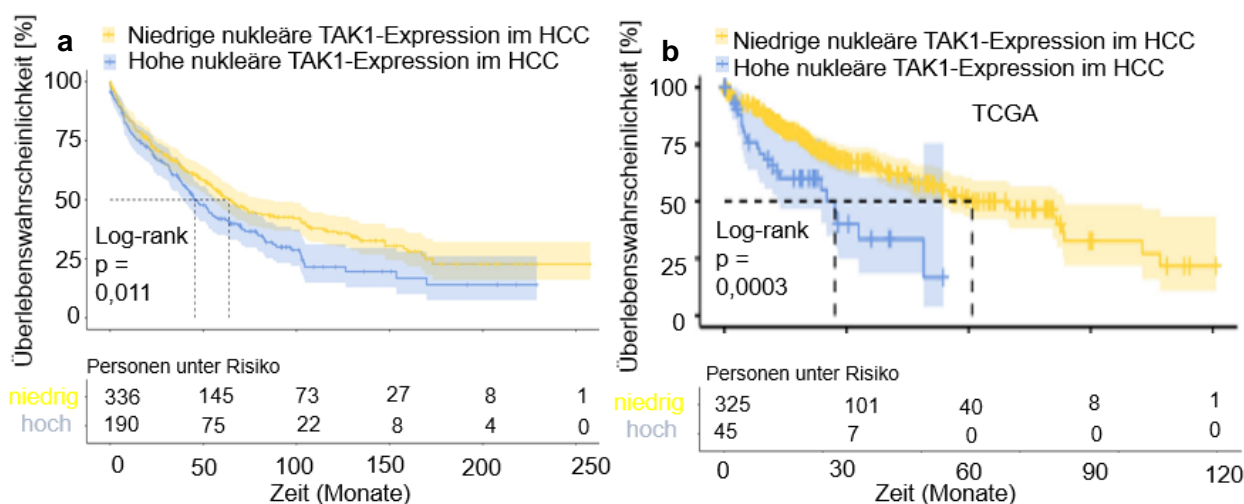


Abb. 3.11: Kaplan-Meier-Analyse der TAK1-Expression in HCCs. Assoziation einer hohen TAK1-Expression mit kürzerem Überleben und schlechter Prognose. a) Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve in Bezug auf hohe (blaue Kurve, IRS > 3,58) bzw. niedrige (gelbe Kurve, IRS < 3,58) nukleäre TAK1-Expression im HCC. Aufgetragen ist die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit in Prozent mit dem Eintreten des Todes als „Ereignis“ gegen die Zeit in Monaten. HR 1,34; 95%-KI 1,07 bis 1,69; Log-rank 0,010600. b) Kaplan-Meier-Gesamtüberlebenskurve in Bezug auf hohe bzw. niedrige TAK1-mRNA-Expression der TCGA-Kohorte.

Die multivariate Analyse identifizierte bekannte prognostische Faktoren wie BCLC- und ECOG-Stadien sowie makrovaskuläre Gefäßinvasion, wobei sich eine hohe TAK1-Expression hier nicht als statistisch unabhängiger prognostischer Parameter behaupten konnte (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Uni- und multivariate Cox-Regressionsanalyse von klinisch-prognostischen Faktoren und TAK1 (Gesamtüberleben)

Cox-Regressions-analyse	Univariat			Multivariat		
	Hazard Ratio	Standard-fehler	p-Wert	Hazard Ratio	Standard-fehler	p-Wert
klinische Merkmale						
Alter (≥60 vs. <60)	1,43	0,12	0,003	1,45	0,13	< 0,01
Geschlecht (m vs. w)	1,07	0,13	0,637			
ASH (ja vs. nein)	0,87	0,12	0,250			
NASH (ja vs. nein)	1,08	0,22	0,738			
Hämochromatose	0,70	0,27	0,186	0,69	0,28	0,187
HBV (ja vs. nein)	0,89	0,14	0,400			
HCV (ja vs. nein)	1,07	0,14	0,608			
ECOG (1-4 vs. 0)	1,43	0,12	0,003	1,37	0,13	0,015
BCLC (B-D vs. A)	1,83	0,16	< 0,001	1,58	0,18	0,010
AFP Serum > vs. ≤ 200 ng/ml	1,56	0,12	< 0,0001			
pathologische Merkmale						
Grading (G3 vs. G1/2)	1,50	0,13	0,003	1,29	0,14	0,075
Gefäßinvasion (mikrovaskuläre vs. keine)	1,49	0,14	0,004	1,34	0,16	0,064
Gefäßinvasion (makrovaskuläre vs. keine)	3,20	0,15	< 0,0001	2,94	0,16	< 0,0001
makrotrabekulärer Subtyp (ja vs. nein)	1,96	0,19	< 0,001			
hohe nukleäre TAK1-Expression (IRS < vs. >3,58)	1,34	0,12	0,011	1,07	0,13	0,587

3.5.2 Assoziation der TAK1-Expression mit weiteren klinischen Parametern

Zur Frage einer möglichen prognostischen oder prädiktiven Aussagekraft der TAK1-Expression wurde die TAK1-Expression mit weiteren klinisch-pathologischen und molekularen Parametern korreliert. In unserem Kollektiv war TAK1 in humanen HCCs im Vergleich zum nicht-neoplastischen Lebergewebe unabhängig von der Ätiologie signifikant induziert (Abb. 3.12 a-e). Auffällig war, dass die nukleäre TAK1-Expression bei zugrundeliegender chronischer Hepatitis C sowohl im HCC als auch im nicht-neoplastischen Lebergewebe signifikant niedriger war (Abb. 3.12 g-h). Bei anderen Ätiologien wie ASH, NASH, HBV und Hämochromatose war eine entsprechende Assoziation nicht zu eruieren (Tab. 3.2). Es wurde eine schwache Korrelation zwischen höherem Alter und der nukleären TAK1-Expression im HCC und zugehörigem Lebergewebe festgestellt (Abb. 3.12 f). Es bestand keine Korrelation mit dem Serum-Parameter AFP (Tab. 3.2). Eine hohe nukleäre TAK1-Immunreaktivität von primären HCCs (IRS > 3,58) war zudem mit großen Tumoren assoziiert (Tab. 3.2).

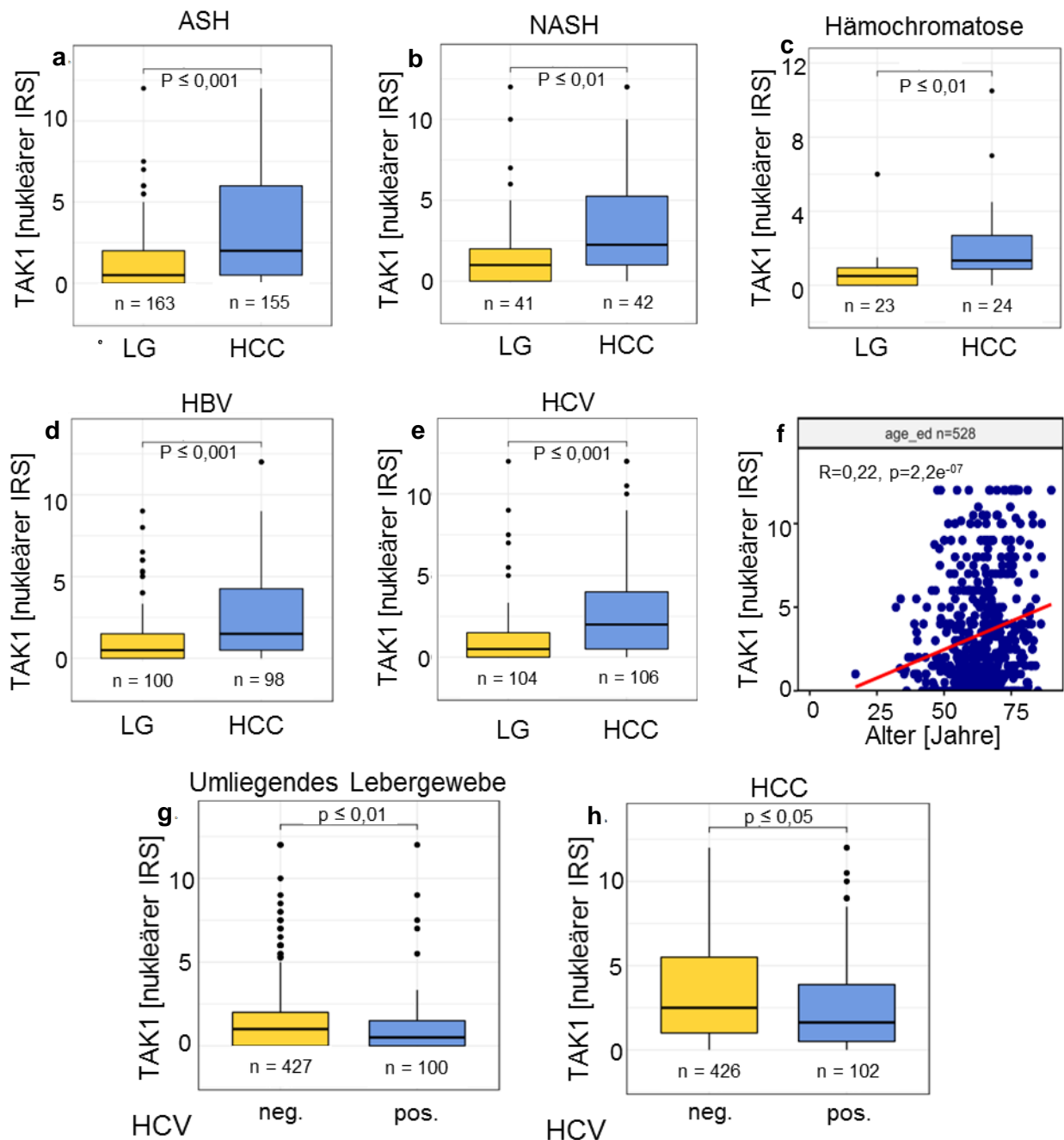


Abb. 3.12: Korrelation der TAK1-Expression im HCC mit klinischen Parametern. a-e) Nukleärer TAK1-IRS im HCC und zugehörigen Lebergewebe in der jeweiligen Subgruppe der Patienten mit NASH, ASH, Hämochromatose, HBV, HCV. f) Streudiagramm: Korrelation des Alters in Jahren mit der nukleären TAK1-Expression als IRS; $R = 0,22, p = 2,2e^{-7}, n = 528$. g-h) Quantifizierung der immunhistochemisch detektierten nukleären TAK1-Expression in Bezug auf HCV-bedingte Leberzirrhose (andere oder keine Lebergrunderkrankung: $n = 427$; HCV: $n = 100$) und im HCC (andere oder keine Lebergrunderkrankung: $n = 426$; HCV: $n = 102$). Abk.: ASH = alkoholische Steatohepatitis, NASH = nicht-alkoholische Steatohepatitis, HBV = Hepatitis B Virus, HCV = Hepatitis C Virus, neg. = negativ, pos. = positiv.

Tab. 3.2: Klinische Parameter in Bezug auf die TAK1-Expression

Klinische Parameter	Niedrige nukleäre TAK1-Expression	Hohe nukleäre TAK1-Expression	p-Wert	Niedrige zytoplasmatische TAK1-Expression	Hohe zytoplasmatische TAK1-Expression	p-Wert
ASH	99 (29%)	56 (29%)	> 0,9	134 (29%)	21 (29%)	> 0,9
NASH	27 (8%)	15 (7,8%)	> 0,9	34 (7,5%)	8 (11%)	0,3
Hämochromatose	20 (6%)	4 (2,1%)	0,04	23 (5,1%)	1 (1,4%)	0,2
HBV	67 (20%)	31 (16%)	0,3	84 (18%)	14 (19%)	0,9
HCV	78 (23%)	28 (15%)	0,017	92 (20%)	14 (19%)	0,8
mittleres Alter [Jahre]	62,6	66,3	< 0,001	65,2	60,4	0,007
max. Durchmesser [mm]	36	50	< 0,001	41	38	> 0,9
BCLC			< 0,001			0,8
A	74 (22%)	20 (10%)		79 (17%)	15 (21%)	
B	201 (60%)	138 (72%)		292 (64%)	47 (64%)	
C	34 (10%)	27 (14%)		53 (12%)	8 (11%)	
D	27 (8%)	7 (3,6%)		31 (6,8%)	3 (4,1%)	
ECOG			0,7			> 0,9
0-1	320 (96%)	185 (97%)		436 (96%)	69 (97%)	
2	7 (2,1%)	2 (1,1%)		8 (1,8%)	1 (1,4%)	
3	3 (0,9%)	2 (1,1%)		5 (1,1%)	0 (0%)	
4	5 (1,5%)	1 (0,5%)		5 (1,1%)	1 (1,4%)	

3.5.3 Assoziation der TAK1-Expression mit pathologischen Parametern

Des Weiteren wurde die TAK1-Expression mit verschiedenen pathologischen Parametern korreliert. In der aktuellen WHO-Klassifikation werden verschiedene morphologische Subtypen unterschieden, die mit unterschiedlicher Prognose einhergehen (Lokuhetty, 2019; (Calderaro *et al.*, 2017; Nagtegaal *et al.*, 2020). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den morphologisch definierten Subtypen und der TAK1-Expression war nicht zu eruieren. Es fiel lediglich eine niedrigere TAK1-Expression in HCCs von steatohepatitischem Subtyp auf als in HCCs mit trabekulärem Wachstumsmuster oder dem makrotrabekulärem Subtyp (Abb. 3.13 a). In dysplastischen Knoten war TAK1 gegenüber dem nicht-neoplastischen Lebergewebe nicht signifikant vermehrt (Abb. 3.13 b). Auch HCC-Tumorthrombi in Gefäßen zeigten keine signifikant höhere TAK1-Expression im Vergleich zum Primärtumor ($p = 0,21$). Zwischen einem erhöhten TAK1-IRS und dem Grading bestand keine Korrelation (Abb. 3.13 c). Die BCLC-Stadien B und C waren in der Gruppe der Tumoren mit hoher TAK1-Expression überrepräsentiert, während das BCLC A-Stadium hier seltener auftrat (Tab. 3.2). Die TAK1-Immunreaktivität war in HCCs mit Glutaminsynthetase-Überexpression ($IRS \geq 9$) signifikant erhöht (Abb. 3.13 d). Glutaminsynthetase ist ein Enzym, das durch Wnt aktiviert wird und ist ein immunhistochemischer Surrogatparameter bei CTNNB1-mutierten HCCs (Zucman-Rossi *et al.*, 2007).

Ergebnisse

Eine leichte Korrelation des TAK1-IRS zeigte sich mit HSP70 (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $R = 0,28$) sowie mit 4-Hydroxynonenal (4-HNE) ($R = -0.15$) als Marker für oxidativen Stress (Gasparovic *et al.*, 2017). Zwischen der TAK1-Expression und H2A.X, einem Marker für DNA-Doppelstrangbrüche, war kein signifikanter Zusammenhang nachweisbar. Die TAK1-Expression korrelierte auch nicht mit der Expression von CK19 als bekannten, mit einer schlechten Prognose assoziierten Marker im HCC (Durnez *et al.*, 2006) und dem weit verbreiteten prognostischen Serummarker AFP.

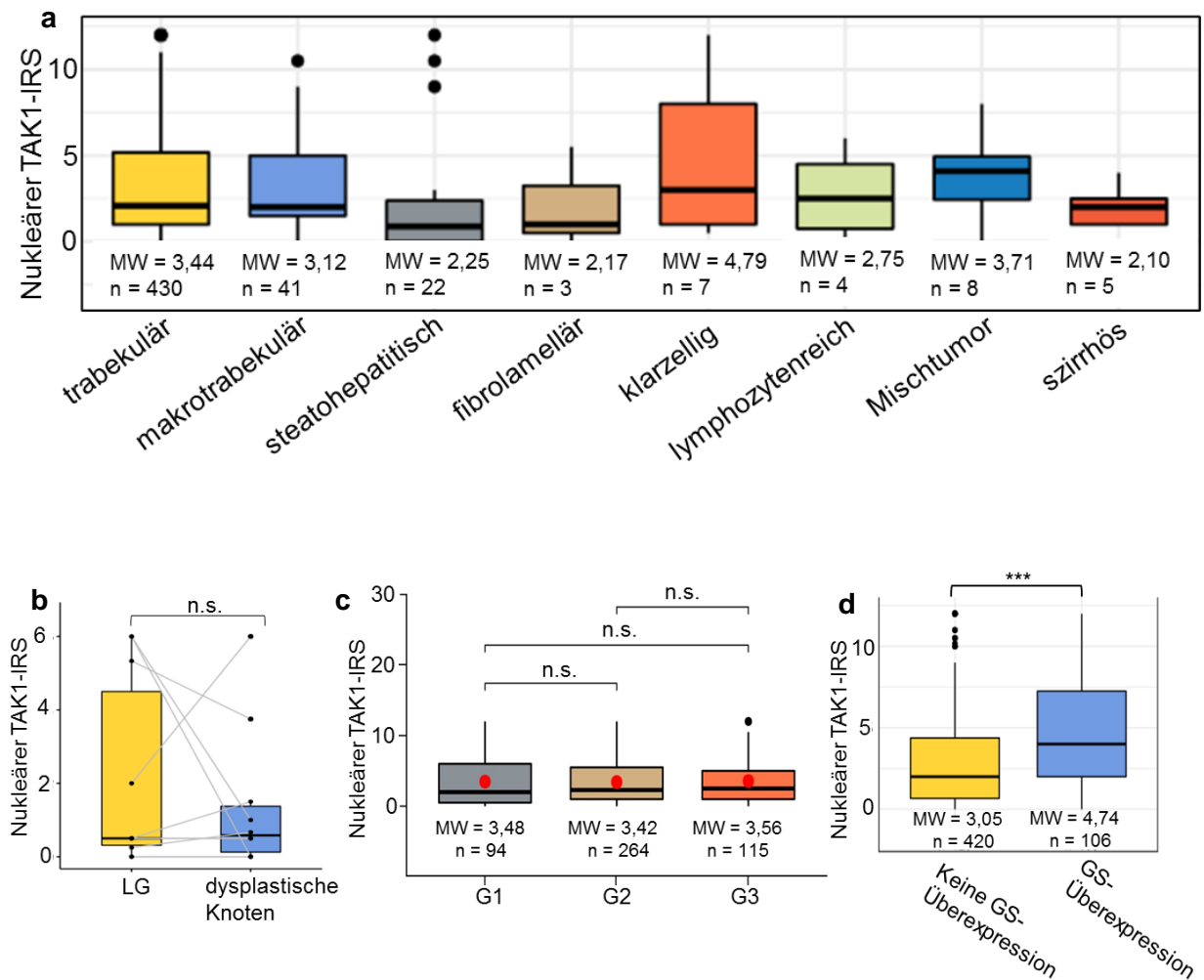


Abb. 3.13: TAK1-Expression und pathologische sowie molekulare Parameter. a) Quantifizierung der nukleären TAK1-Expression in Bezug auf den morphologischen Tumortyp. Dargestellt sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung. b) Quantifizierung der nukleären TAK1-Expression in dysplastischen Knoten. c) Quantifizierung der TAK1-Expression in HCCs verschiedener Gradings (G1: $n = 94$, G2: $n = 264$, G3: $n = 115$). d) TAK1-Expression in Relation zur Glutaminsynthetase-Überexpression als Korrelat einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs (GS neg.: $n = 420$, pos.: $n = 106$), $p = 1,34e^{-06}$. Für alle Analysen gilt * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0.001$.

3.5.4 Assoziation der TAK1-Expression im HCC mit Gefäßinvasion

Die TAK1-Expression war in humanen HCCs statistisch signifikant mit mikro- und makrovaskulärer Gefäßinvasion assoziiert (Abb. 3.14 a, Tab. 3.1). HCCs mit Gefäßinvasion zeigten hierbei eine signifikant höhere TAK1-Expression als HCCs ohne Gefäßinvasion. Das *Vessels encapsulating tumor clusters*-(VETC-)Muster ist ein mit CD34 detektierbares Gefäßmuster, das mit schlechter Prognose einhergeht und mit vermehrten Gefäßeinbrüchen assoziiert ist (Renne *et al.*, 2020). HCCs mit durch CD34-Immunhistochemie nachweisbarem VETC-Muster zeigten eine signifikant höhere TAK1-Expression ($p < 0,001$; Abb. 3.14 b). Auch zeigten HCCs mit hoher TAK1-Expression eine höhere Gefäßdichte als solche mit geringer TAK1-Expression ($p \leq 0,01$; Abb. 3.14 c, d). Die TAK1-Expression erwies sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht als statistisch unabhängiger Parameter (Tab. 3.1).

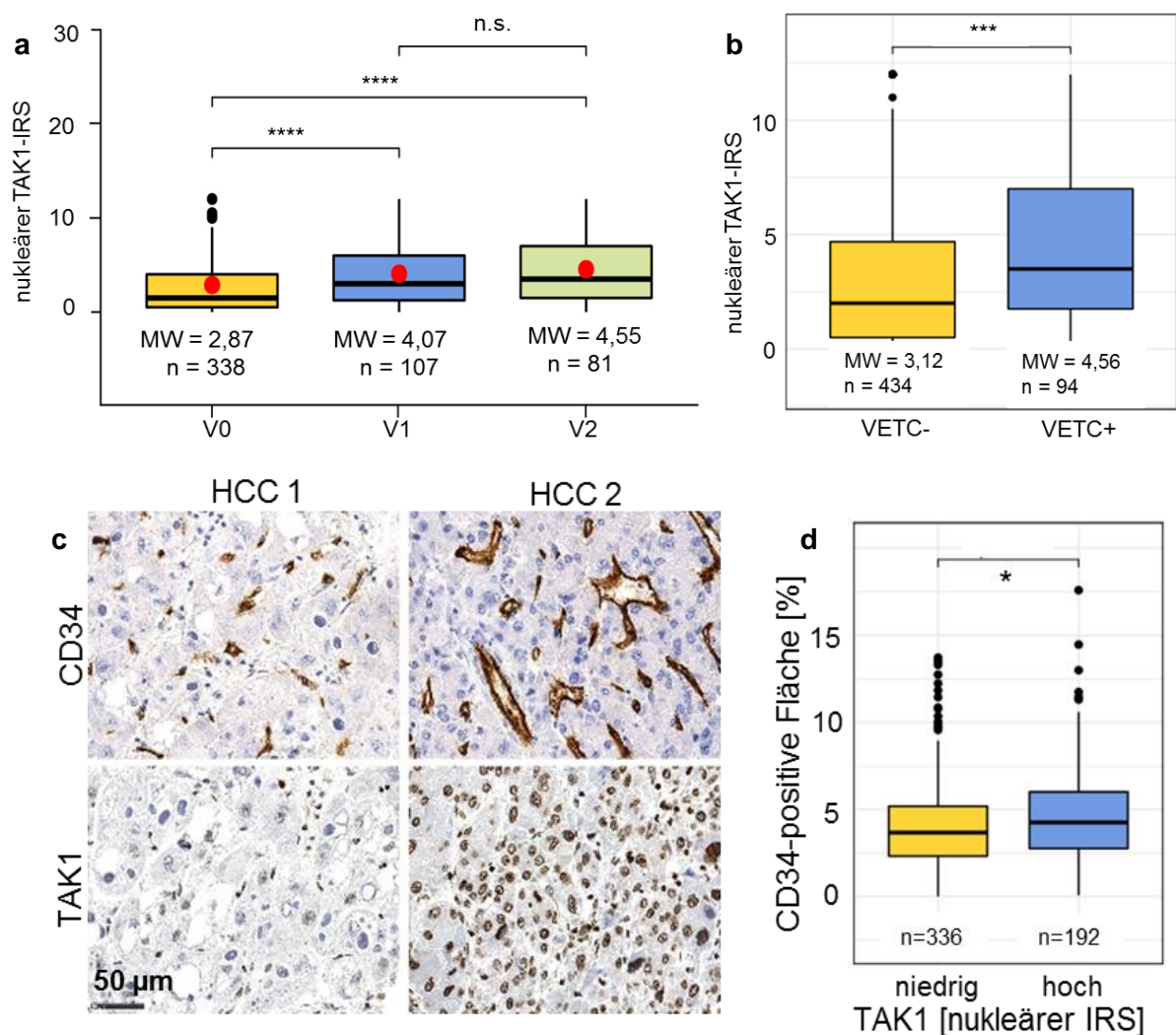


Abb. 3.14: TAK1-Expression in HCCs in Bezug auf tumoröse Gefäßinvasion, VETC-Muster und intratumorale Gefäßdichte. a) Quantifizierung der immunhistochemisch detektierten TAK1-Expression in Bezug auf Gefäßinvasion (V0: n = 338; V1: n = 107, V2: n = 81). Assoziation einer hohen TAK1-Expression mit mikro- und makrovaskulärer Gefäßinvasion. b) Quantifizierung der TAK1-Expression in Bezug auf An- oder Abwesenheit des VETC-Musters (VETC-: n = 434, VETC+: n = 94). c) Repräsentative Färbungen für CD34 in einem Tumor mit niedriger und einem Tumor mit hoher TAK1-Expression. d) Quantifizierung der CD34-positiven Gefäßdichte in Bezug auf niedrige oder hohe nukleäre TAK1-Expression ($p \leq 0,01$).

3.6 Subzelluläre Lokalisation von TAK1

3.6.1 TAK1-Immunhistochemie

In der Literatur wird die subzelluläre Lokalisation von TAK1 überwiegend als zytoplasmatisch beschrieben (Jadrich *et al.*, 2003; Stockert *et al.*, 2013). Im humanen HCC- und Lebergewebe war TAK1 in diesen Untersuchungen jedoch hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Zusätzlich war TAK1 immunhistochemisch oft auch perinukleär nachweisbar. Teilweise war auch eine TAK1-Färbung im Zytoplasma vorhanden, eine rein zytoplasmatische Färbung lag selten vor. Bei der manuellen TAK1-Auswertung wurde die nukleäre sowie die zytoplasmatische TAK1-Expression jeweils getrennt bewertet. Die Auswertung mit der Software HALO ermöglichte eine getrennte, automatisierte Auswertung der nukleären und zytoplasmatischen TAK1-Expression. Die TAK1-Expression in Entzündungszellen wurde nach Möglichkeit nicht in die Auswertung eingeschlossen, sondern lediglich die TAK1-Färbung der Hepatozyten. Zur Unterscheidung zwischen tatsächlicher Färbung und dem im nicht-neoplastischen Lebergewebe gelegentlich schwach nachweisbaren lysosomalen braunen Abbauprodukt Lipofuszin oder Gallepigment wurde in manchen Fällen die HE-Färbung herangezogen (Abb. 3.15).

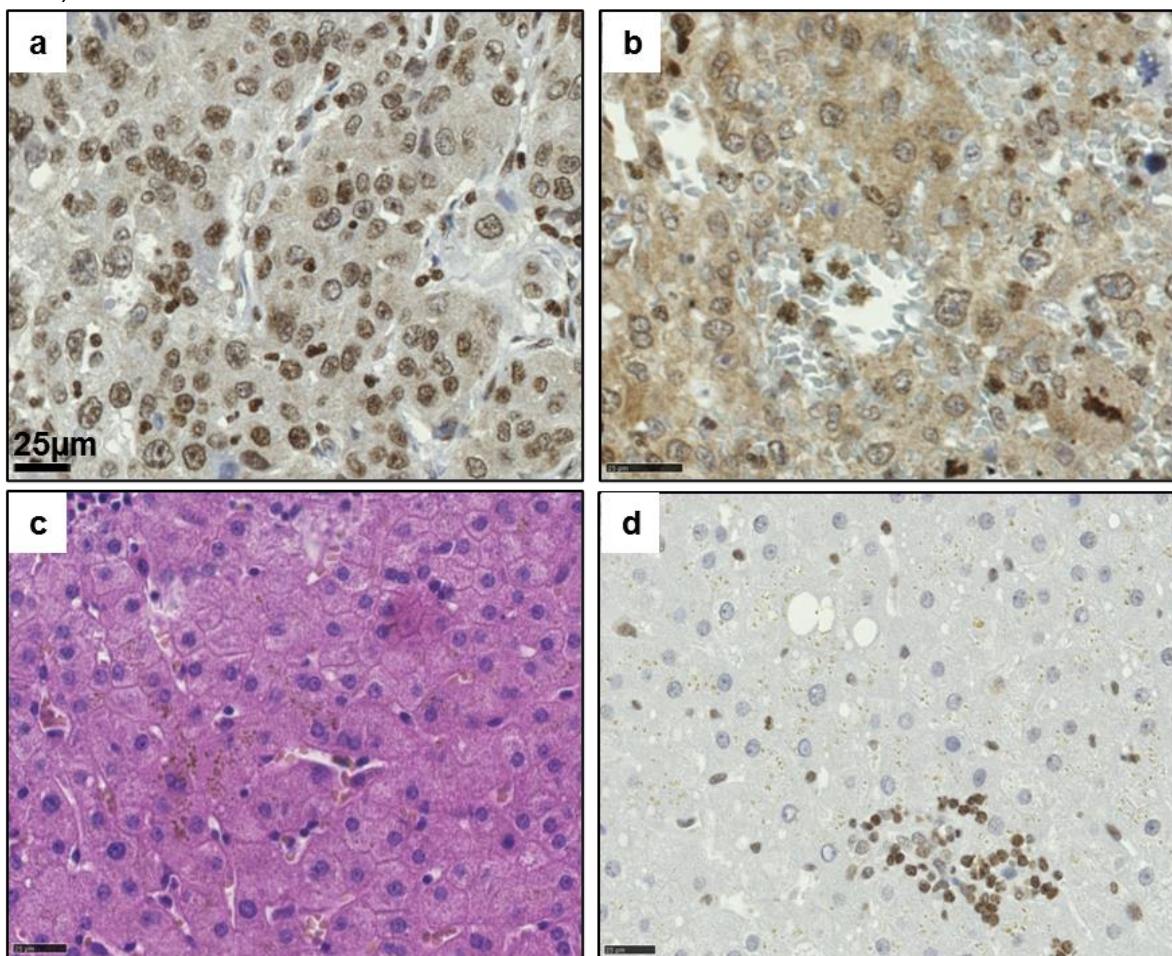


Abb. 3.15: TAK1-Expressionsmuster in humaner Leber und im HCC. a) Beispiel für (peri-)nukleäre TAK1-Expression in einem HCC (G3). b) Beispiel für zytoplasmatische und (peri-)nukleäre Expression in einem HCC (G3). c) Lipofuszin in Hepatozyten im nicht-neoplastischen Lebergewebe, HE-Färbung. d) TAK1-Positivität in Lymphozyten in nicht-neoplastischem Lebergewebe.

3.6.2 Lokalisation von TAK1 in HCC-Zellkulturen

Die Lokalisation von TAK1 wurde auch in Zellkultur untersucht: Immunfluoreszenzmikroskopisch lokalisierte endogenes TAK1 in Huh7-Zellen vorwiegend zytoplasmatisch (Abb. 3.16 a). Mit konfokaler Laserscanningmikroskopie war die Lokalisation von FLAG bei FLAG-*tag*-transfizierten TAK1-positiven Zellen des Proliferationsassays eher zytoplasmatisch oder teils perinukleär, wie sie auch in der Immunhistochemie teilweise beobachtet wurde (Abb. 3.16 b). Ein Unterschied zwischen den Isoformen war nicht zu erkennen.

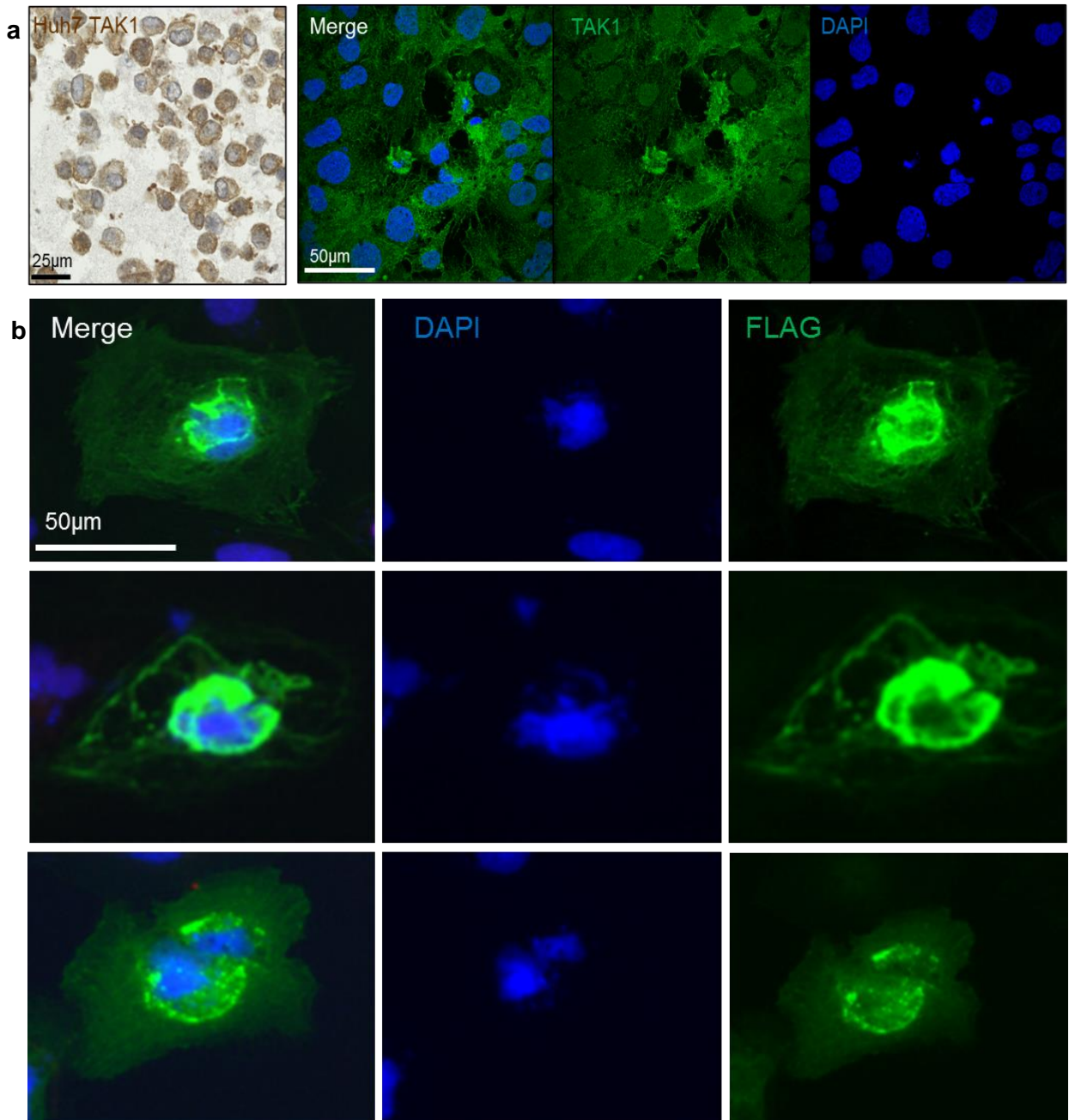


Abb. 3.16: Immunfluoreszenzmikroskopie von FLAG in transient TAK1-transfizierten Huh7-Zellen
a) Konfokale Laserscanningmikroskopie von Huh7-Zellen gefärbt mit TAK1-Antikörpern. Links Zellpellets nach immunhistochemischer Färbung von endogenem TAK1. b) Lokalisation von FLAG-TAK1-transfizierten Huh7-Zellen (Zellkerne blau, FLAG grün).

3.6.3 Lokalisationsstudie von TAK1 in Huh7-Zelllinien mittels Zellfraktionierung und Immunblot

Um die subzelluläre Lokalisation von TAK1 mit einer weiteren Methode zu untersuchen, wurden mittels Zellfraktionierung Zytoplasma- und Kernextrakte hergestellt und analysiert. Kompartimentspezifische Marker dienen der Validierung der Fraktionierung. Für die nukleäre Fraktion wurde das dominant im Zellkern lokalisierte Protein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1, 113 kDa) getestet, für die zytoplasmatische Fraktion wurde Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH, 37 kDa) analysiert. Beide lokalisierten jeweils nur im erwarteten Kompartiment, so dass die Methode technisch valide war. Vergleichend betrachtet wurden auch Gesamtzelllysate.

In HEK293T- und Huh7-Zellen war auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von TAK1 eine überwiegend in der Zytoplasmafraktion nachweisbare Bande zu sehen. Die Bande der TAK1-Kernfraktion war deutlich schwächer. In HepG2-Zellen zeigte sich bei der Entwicklung mit GAPDH nur eine schwache Bande auf Höhe von TAK1 in der nukleären Fraktion (Abb. 3.17). Die Fraktionierung schien somit grundsätzlich zu funktionieren und TAK1 war in den Lysaten der Zelllinien auch im geringen Maß in der Kernfraktion nachweisbar.

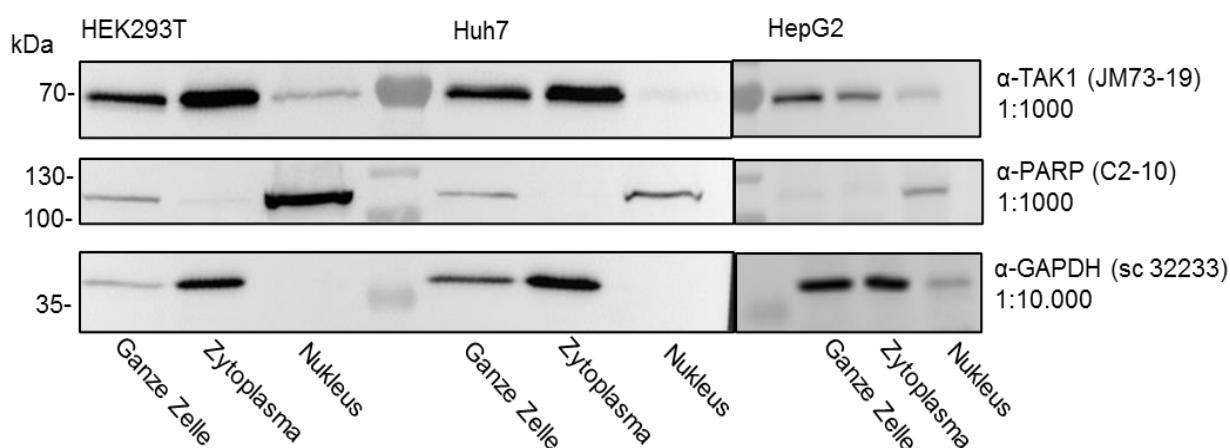


Abb. 3.17: Immunblot-Analyse von HEK293T-, Huh7- und HepG2-Zellfraktionen von Zytoplasma und Zellkern. Detektion mit α-TAK1 (JM73-19), Kontrolle der Fraktionierung mit dem nukleären Marker α-PARP (C2-10) und dem zytoplasmatischen Marker α-GAPDH (sc 32233). Größenmarker linkerhand.

3.6.4 Analyse von TAK1 nach nukleärer und zytoplasmatischer Fraktionierung

Nachdem die Fraktionierungsmethode in Zelllinien erfolgreich war, sollte diese auch bei Kryogewebe von HCCs und Lebergewebe angewendet werden, um die in der Immunhistochemie beobachtete, vorwiegend nukleäre Lokalisation von TAK1 zu bestätigen. Insbesondere in einigen HCC-Proben konnte entweder kein TAK1-Signal oder nur eines in der Zellkernfraktion detektiert werden, während im zugehörigen Lebergewebe eine TAK1-Bande oft nur im Gesamtlysat erschien.

Ergebnisse

Proben mit einer starken TAK1-Expression im Gesamtlysat wurden erneut mit längerer Einwirkdauer von Puffer A fraktioniert. TAK1-Signale waren nun in allen Fraktionen nachweisbar, jedoch war auch das eigentlich nicht im Kern vorkommende Protein GAPDH hier in allen Fraktionen zu detektieren. Da der PARP-Antikörper im Gewebe kein nachweisbares Signal erzielte, wurde mit dem Phosphohiston H3-Antikörper ein alternativer Kernmarker verwendet. Phosphohiston H3 wurde mit einem Molekulargewicht von 16,5 kDa nachgewiesen. Zusätzlich waren möglicherweise unspezifische Banden erkennbar (Abb. 3.18).

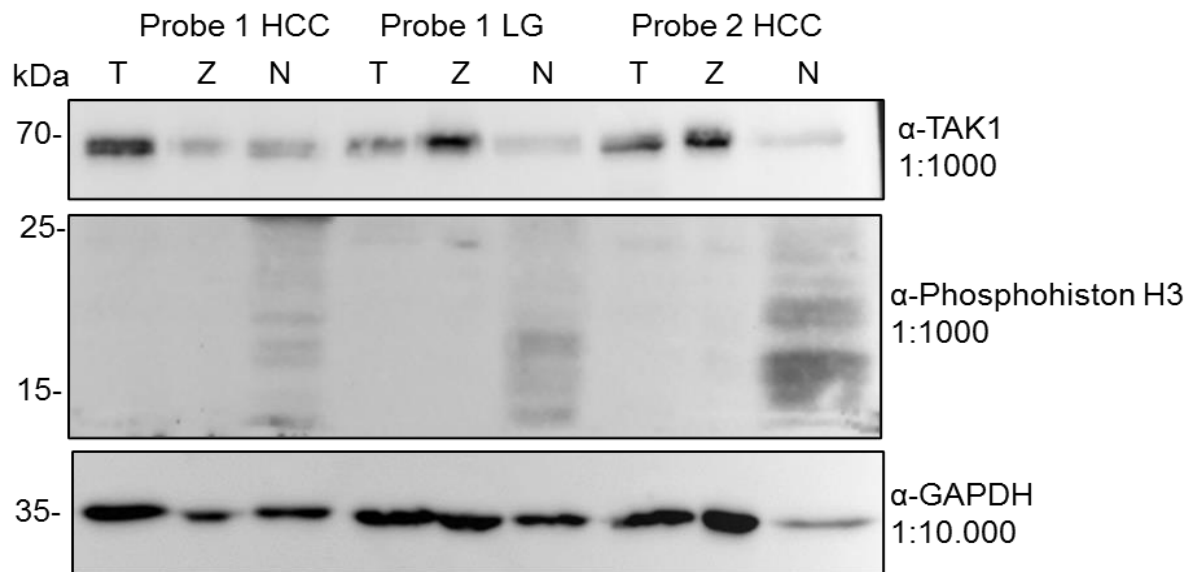


Abb. 3.18: Immunblotanalyse von HCC- und Lebergewebeproben nach Fraktionierung. HCC- bzw. Lebergewebeproben, die vorher im Gesamtlysat (T) eine große Menge TAK1 enthielten, hier exemplarisch zwei HCC-Proben und eine Lebergewebe-(LG-)Probe nach Fraktionierung mittels Zweipuffersystem. Abk.: Z = zytoplasmatische Fraktion, N = Kernfraktion.

Da die Fraktionierung des zuvor tiefgefrorenen Gewebes unter den beschriebenen Bedingungen bislang nicht zufriedenstellend verlaufen war, erfolgte anschließend eine Fraktionierung von Frischgewebe (Abb. 3.19). Im Gesamtlysat war ein schwaches TAK1-Signal nachweisbar, wohingegen in der Kern- und Zytoplasmafraktion kein Signal für TAK1 detektiert werden konnte. GAPDH war im nicht-neoplastischen Lebergewebe nur in der Zytoplasmafraktion nachweisbar, während es im HCC auch in der Zellkernfraktion schwach detektiert wurde. Nach Erhöhung der geladenen Proteinmenge konnten zwei Banden in den Gesamtzelllysaten auf Höhe von 70 kDa und 68 kDa detektiert werden, welche TAK1 entsprechen. Sowohl in der Zytoplasmafraktion des Lebergewebes als auch in der Zytoplasma- und Kernfraktion des HCCs war jeweils eine sehr schwache TAK1-Bande im Immunblot nachweisbar.

Grundsätzlich konnte somit die Expression von TAK1 im nukleären Kompartiment bestätigt werden, auch wenn die Methodik der Fraktionierung und Detektion mittels Immunblot im humanen Lebergewebe schwierig war.

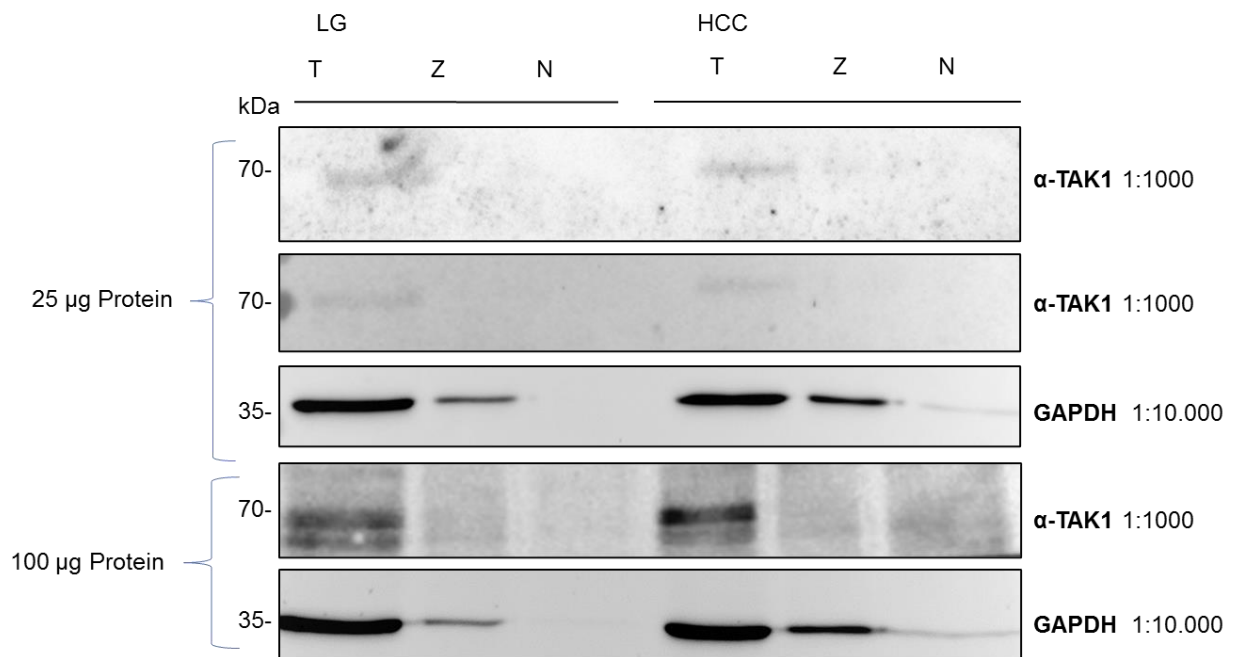


Abb. 3.19: Immunblotanalyse von Gesamtzelllysaten sowie von zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen von Leber- und HCC-Gewebe. Proteinlysate nach Kollagenaseverdau als Gesamtlysate (T) und in Fraktionen (N = Kernfraktion, Z = Zytosolfraktion). 25 µg bzw. 100 µg Proteinmenge wurden geladen, Größenmarker links, Färbung mit α-TAK1-Antikörper sowie mit α-GAPDH-Antikörper als zytoplasmatischen Marker.

3.7 Die Rolle von TAK1 im alternativen NF-κB-Signalweg

Grundsätzlich wird TAK1 in erster Linie als eine Komponente des klassischen NF-κB-Signalwegs gesehen (Roh *et al.*, 2014; Mihaly *et al.*, 2014).

In der immunhistochemischen Analyse des TMAs war in den durchgeführten Vorversuchen der Arbeitsgruppe jedoch eine Induktion der im alternativen NF-κB-Signalweg wichtigen NF-κB-Untereinheit RELB im HCC sowie eine Korrelation von TAK1 und RELB im HCC-Gewebe beobachtet worden. Im Immunblot konnte RELB im HCC und im nicht-neoplastischen Lebergewebe detektiert werden, wenngleich in den wenigen untersuchten Proben in der densitometrischen Quantifizierung keine signifikante Induktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.20 a, b).

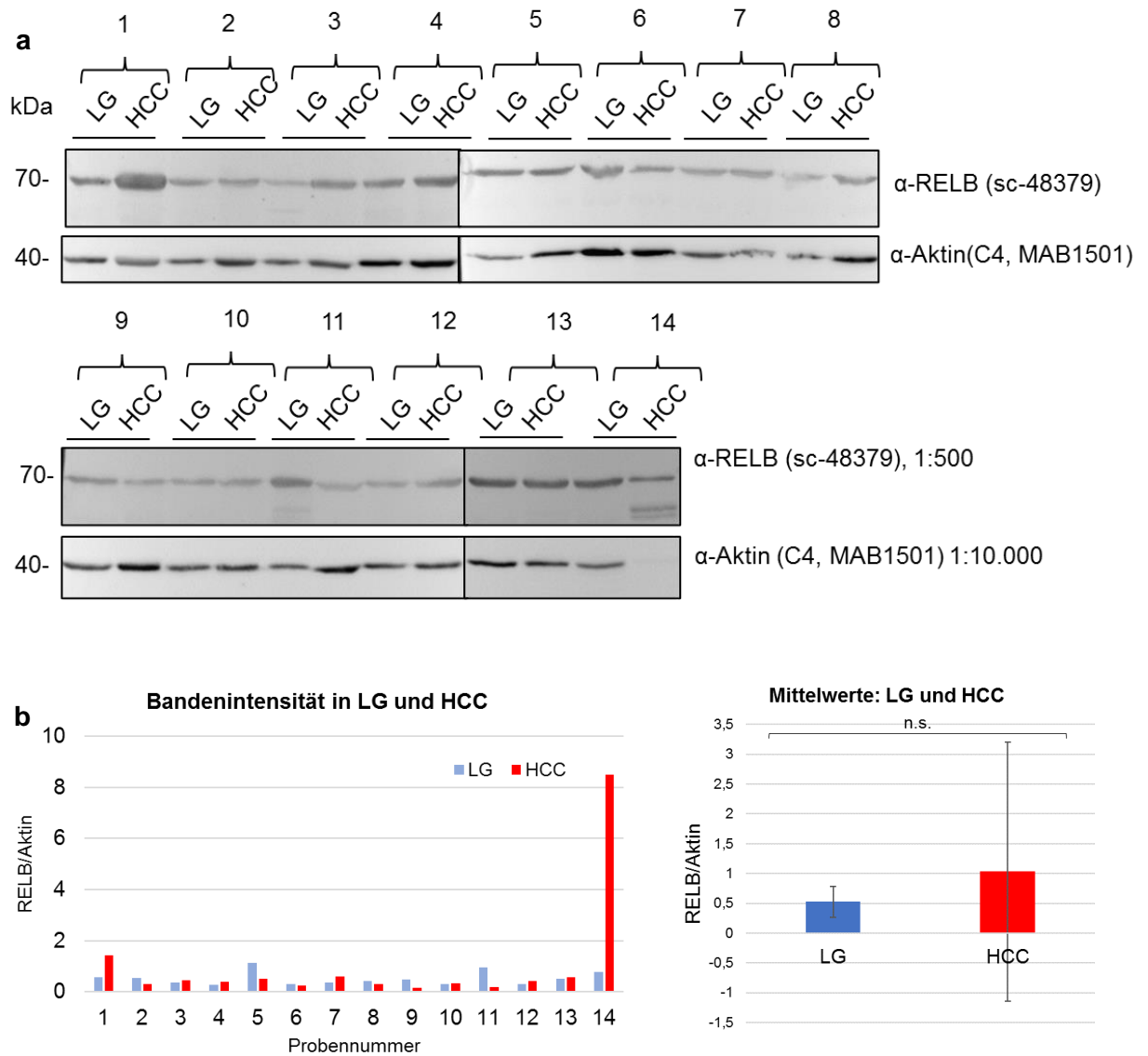


Abb. 3.20: Expressionsanalyse von RELB mittels Immunblot im HCC und zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergewebe. a) Immunblot mit Antikörpern gegen RELB und Aktin als Ladekontrolle: 14 Proben mit 30 µg Protein eines Gesamtzelllysats von LG und HCC wurden alternierend geladen. Größenmarker in kDa auf der linken Seite. b) Densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden des Immunblots aus (a). Links: Balkendiagramm der ermittelten Bandenintensitäten im LG (blau) und HCC (rot) nach Normalisierung mit Aktin. Rechts: Mittelwert der Werte aus b links (LG und HCC gepoolt), t-Test: keine signifikante Induktion von RELB im HCC.

Um eine mögliche Aktivierung des alternativen Signalwegs durch TAK1 zu detektieren, wurde die am alternativen Signalweg beteiligte NF-κB-Untereinheit p100 und ihre durch proteolytische Spaltung entstehende, aktive Form p52 mittels Immunblot untersucht. Für NF-κB waren Proteinbanden bei über 100 kDa und bei ca. 52 kDa nachweisbar (Abb. 3.21). Die Überexpression der beiden TAK1-Isoformen resultierte jedoch nicht in einer eindeutigen Induktion von p52 als Maß einer Aktivierung des alternativen NF-κB-Signalwegs.

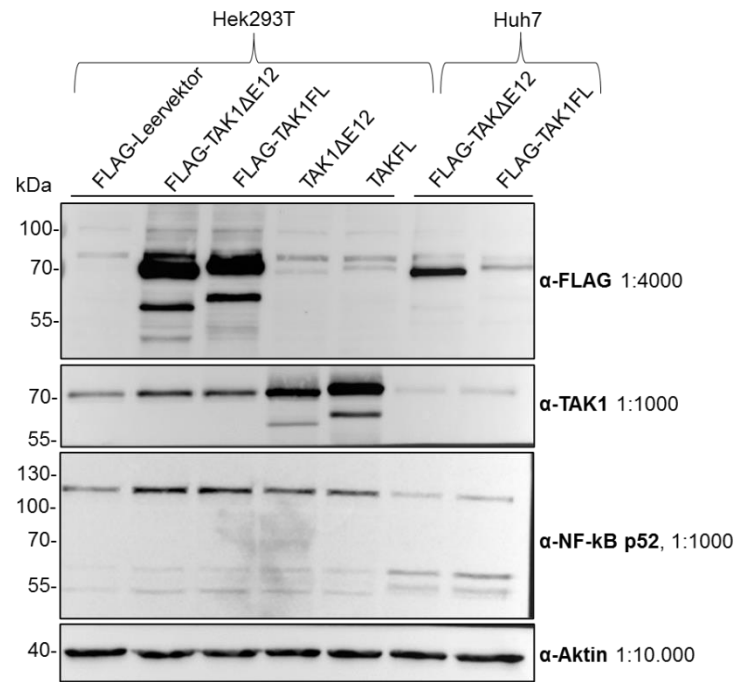


Abb. 3.21: Expression von TAK1 und RELB in Zellkultur. a) Immunblot von NF-κB p52 in Zelllysaten der mit TAK1 transfizierten HEK293T und Huh7-Zellen, zum Vergleich Immunblot mit Antikörpern gegen FLAG und TAK1 sowie Aktin als Ladekontrolle. Größenmarker in kDa auf der linken Seite.

4 Diskussion

4.1 Induktion von TAK1 im HCC und dessen Einfluss auf das Patientenüberleben

Viele Studien zur Rolle von TAK1 im HCC basieren auf *Knockout*-Mausmodellen, in denen eine TAK1-Deletion zur Entstehung von HCCs führte (Roh *et al.*, 2014). Daher bestand die Hypothese, dass TAK1 in humanen HCCs möglicherweise herunterreguliert ist. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit zeigte sich jedoch anhand eines 561 Patienten umfassenden Kollektivs, dass die MAPKKK TAK1 im HCC gegenüber dem umliegenden, nicht-neoplastischen Lebergewebe signifikant induziert ist und eine hohe TAK1-Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben einhergeht. Die prognostische Aussagekraft einer hohen TAK1-Expression konnte in dem unabhängigen Patientenkollektiv der öffentlich zugänglichen TCGA-Kohorte bestätigt werden (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017; Cheng *et al.*, 2019). Die in der Immunhistochemie beobachtete TAK1-Induktion bestätigte sich im Immunblot mit Zelllysaten humaner Leberproben. Immunzellen exprimieren ebenfalls TAK1 (Ajibade *et al.*, 2013), was auch die im Rahmen dieser Studie durchgeführten immunhistochemischen Färbungen zeigten. In einem deutlich kleineren Kollektiv (n = 107) von Cheng und Koautoren wurde zwischenzeitlich ebenfalls eine TAK1-Induktion im HCC mit Korrelation einer hohen TAK1-Expression mit schlechter Prognose beobachtet (Cheng *et al.*, 2019).

Auch in anderen Tumorentitäten war die Expression von TAK1 im Vergleich zum nicht-neoplastischen Lebergewebe erhöht und mit schlechter Prognose assoziiert: Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ging eine negative TAK1-Immunhistochemie mit einem längeren Gesamt- und krankheitsfreien Überleben einher als bei TAK1-Positivität (Wen *et al.*, 2013). Auch in Osteosarkomen, Schilddrüsenkarzinomen und Adenokarzinomen des Magens war TAK1 gegenüber dem umliegenden Normalgewebe induziert und die TAK1-Expression mit schlechter Prognose assoziiert (Wei, 2016). Ebenso wurde eine Hochregulation von TAK1 in Ovarialkarzinomen nachgewiesen (Cai *et al.*, 2014). In Prostatakarzinomen wurde eine Deletion in dem Genbereich 6q14-21 festgestellt, der unter anderem für MAP3K7 kodiert, so dass TAK1 immunhistochemisch im Karzinom signifikant weniger exprimiert wurde als im Prostatanormalgewebe (Liu *et al.*, 2007). Bei der T-ALL und AML wurden TAK1-Deletionen beschrieben, wobei das Fehlen von TAK1 jedoch in keinem Zusammenhang zu klinischen Merkmalen wie Therapieansprechen und klinischem Verlauf stand (Cordas dos Santos *et al.*, 2018). Zusammenfassend scheint TAK1 in humanen Tumoren eher als Tumorpromotor zu fungieren, kann aber je nach Krebsart bzw. unter bestimmten Bedingungen ebenso als Tumorsuppressor wirken (Mukhopadhyay und Lee, 2020). Die TAK1-Homöostase ist für die Leber-Homöostase von zentraler Bedeutung (Qian *et al.*, 2022).

Eine TAK1-Deletion in *Knockout*-Mausmodellen führte zur Entstehung von HCCs, wofür es verschiedene Erklärungsansätze gibt: Bei hepatozytenspezifischem TAK1-*Knockout* (TAK1 Δ HEP) in Mäusen ergab sich nach TNF- α Stimulation eine proapoptotische Wirkung. Durch massiven Zelluntergang wurde eine kompensatorische Hyperproliferation bewirkt, so dass sich nach ca. 4 Monaten AFP-exprimierende Lebertumore entwickelten (Inokuchi *et al.*, 2010). In Mäusen mit hepatozytenspezifischem TAK1-*Knockout* (TAK1 Δ HEP) wurde die antiapoptotische und prokarzinogene Wirkung der TAK1-Deletion auf eine TGF- β -vermittelte kompensatorische Phosphorylierung und Aktivierung von Smad 2/3 zurückgeführt (Yang *et al.*, 2013). Weiterhin besteht die Vermutung einer NEMO-abhängigen Karzinogenese bei TAK1-Deletion in Mäusen, da bei TAK1-Deletion die Tumorentstehung erhöht war, bei zusätzlicher NEMO-Deletion dagegen erniedrigt (Bettermann *et al.*, 2010). Bei diesen komplexen Mechanismen spielen wahrscheinlich mehrere Faktoren eine Rolle. Da jedoch meistens nur ein TAK1-*Knockout* und keine TAK1-Überexpression in Mäusen durchgeführt wurde, sind die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf eine hohe TAK1-Expression in den humanen HCCs übertragbar. Möglicherweise bestehen auch Unterschiede zwischen dem artefiziell herbeigeführten kompletten Gen-*Knockout* und einer sehr geringen Gen-Expression. Vermutlich divergieren die Ergebnisse mit sowohl tumorfördernder als auch -hemmender Funktion von TAK1 auch je nach Art der TAK1-Stilllegung und dem entsprechend verwendeten Mausmodell (Vucur *et al.*, 2010). In humanen HCCs fanden sich auch kaum deletäre TAK1-Mutationen (Xia *et al.*, 2021), so dass diese in der HCC-Entstehung bei der Mehrheit der Patienten offenbar keine Rolle spielen. Eine Einschränkung der hier vorliegenden Studie ist, dass nur resezierte HCCs von Patienten mit Leberteilresektion oder Lebertransplantation in die Studie eingeschlossen wurden und keine Aussage zur palliativen Situation in fortgeschrittenen Stadien getroffen werden kann.

In weiteren Studien dieser Arbeitsgruppe wurden die Daten des gleichen Kollektivs nach immunhistochemischer Auswertung von CYLD als negativer TAK1-Regulator mit der TAK1-Expression kombiniert. Die schlechteste Prognose wiesen hierbei Patienten mit hoher TAK1-Expression und gleichzeitig niedriger CYLD-Expression im HCC auf, was mit einer starken Aktivierung des CYLD-TAK1-Signalwegs einhergeht. Umgekehrt hatten Patienten mit niedriger TAK1- und gleichzeitig hoher CYLD-Expression im HCC die längsten Überlebenszeiten. Auch wenn sich TAK1 alleine in der multivariaten COX-Regression nicht als unabhängiger statistischer prognostischer Marker herausstellte, war die Kombination beider Marker ein starker und statistisch unabhängiger prognostischer Faktor (Ridder *et al.*, 2022).

4.2 Mögliche Mechanismen der höheren Aggressivität von HCCs mit hoher TAK1-Expression

Mit verantwortlich für die geringere Überlebensdauer und die höhere Aggressivität von HCCs mit hoher TAK1-Expression ist die Aktivierung nachgeschalteter Proteine. TAK1 aktiviert neben den MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Safina *et al.*, 2008). Die Induktion von Zielgenen von NF- κ B fördert verschiedene Mechanismen wie Inflammation, Zellproliferation, Zellüberleben, EMT, Invasion, Angiogenese und Metastasierung (Taniguchi und Karin, 2018). Gleichzeitig wird auch ein negativer Feedback-Mechanismus induziert (Roh *et al.*, 2014; Lee *et al.*). Eine TAK1-Fehlregulation ist an der Tumorprogression beteiligt. Der Zeitpunkt der höchsten Relevanz von TAK1 in der Karzinogenese ist noch ungeklärt. In HCCs wird eine Beteiligung insbesondere bei Tumorentstehung vermutet (Jin *et al.*, 2021). Dagegen entwickelten Mäuse mit hepatozytenspezifischer TAK1-Deletion erst in höherem Alter HCCs (Roh *et al.*, 2014). Wahrscheinlich führt also eine künstlich herbeigeführte Deletion zum HCC, im weiteren Verlauf fungiert TAK1 dann aber als Tumorförderer (Xia *et al.*, 2021).

Die Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2011) kann als eine Ursache für die höhere Aggressivität und schlechtere Prognose von HCCs mit hoher TAK1-Expression angesehen werden. Im hier untersuchten HCC-Kollektiv war die TAK1-Expression in den HCC-Fernmetastasen gegenüber den primären HCCs weiter induziert, was auch in einem HCC-Kollektiv einer anderen Studie mit 107 HCCs beobachtet wurde (Cheng *et al.*, 2019). Die verstärkte TAK1-Expression in Metastasen scheint entitätsübergreifend zu sein und ein wichtiges Charakteristikum von TAK1: Im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wurde eine niedrigere Rate an TAK1-positiven Tumoren in T3N1-Tumoren als in T3N2- und T3N3-Tumoren beobachtet (Wen *et al.*, 2013). In Adenokarzinomen des Magens und in Schilddrüsenkarzinomen korrelierte die TAK1-Expression mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Lin *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017). Ebenso wurde in Osteosarkomen *in vivo* und Ovarialkarzinomen *in vivo und vitro* eine Assoziation zwischen der TAK1-Expression und dem Auftreten von Metastasen festgestellt (Wei, 2016). Als ursächlich wird die transkriptionelle Hochregulation von migrationsfördernden Molekülen wie MMPs durch TAK1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung angenommen (Mukhopadhyay und Lee, 2020), wie sie insbesondere in Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen wurde (Safina *et al.*, 2008). Im Prostatakarzinom ging dagegen eine Deletion des für TAK1 kodierenden Bereichs mit einer höheren Anzahl an Metastasen und fortgeschrittenen Tumorstadien einher (Liu *et al.*, 2007).

Keine der oben genannten Studien hat bei der Untersuchung der Induktion von TAK1 in HCC-Metastasen zwischen den TAK1-Isoformen unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Migrationsverhalten *in vitro* durch Überexpression der zwei am besten analysierten TAK1-

Isoformen untersucht. Huh7-Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und Migrationsassays wurden durchgeführt. Hierbei wanderten die mit der kurzen Isoform (TAK1 Δ E12) transfizierten Zellen in der gleichen Zeit weiter als die mit der langen Isoform transfizierten Zellen (TAK1FL). Es wurde bereits von anderen Autoren beschrieben, dass in Metastasen die kurze TAK1-Isoform dominierte (Tripathi *et al.*, 2019). Eine weitere Studie untersuchte den Einfluss von TAK1 auf das Migrationsverhalten mittels TAK1-*Knockdown* in verschiedenen Zelllinien durch transiente, stabil genetische sowie medikamentöse Herunterregulation. In SK-Hep1- und Huh7-Zellen migrierten die TAK1-defizienten Zellen deutlich weniger (Cheng *et al.*, 2019), was zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen passt. In HA22T-Zellen wurde ebenfalls eine reduzierte Migration beobachtet, in Hep3B-Zellen jedoch eine vermehrte Migration (Cheng *et al.*, 2019). Die zugrundeliegenden Mechanismen für das abweichende Verhalten dieser einen Zelllinie bleiben hierbei ungeklärt. TAK1 scheint das Migrationsverhalten von Tumorzellen also maßgeblich zu beeinflussen.

Im HCC ist das Expressionsniveau von nMet erhöht und scheint zumindest in Zellkulturen bzw. Tiermodellen über TAK1 eine HCC-Entstehung sowie Migration, Invasivität und Metastasierung von HCCs zu fördern (Tey *et al.*, 2017). Weiterhin fördert TAK1 in manchen Tumorentitäten wie z.B. dem Mammakarzinom die Hochregulation metastasenfördernder Moleküle wie MMPs und Chemokin-Rezeptoren (CCR) (Mukhopadhyay und Lee, 2020), wobei die Expression durch NF- κ B reguliert wird (Egeblad und Werb, 2002; Maeda, 2010). Außerdem kontrolliert die Aktivierung von IKK β /NF- κ B die Entstehung von Lebermetastasen durch die Expression von IL-6, welches mit Tumorzellproliferation und Angiogenese assoziiert ist (Maeda *et al.*, 2009). Darüber hinaus scheint der Vorgang der EMT eine wichtige Rolle bei der Metastasenentstehung zu spielen: So ist beispielsweise Twist1 ein wichtiger an der Regulation der EMT beteiligter Transkriptionsfaktor, der durch NF- κ B reguliert wird (Xia *et al.*, 2014).

Die Induktion von TAK1 in Fernmetastasen lässt an ein Modell denken, in dem eine hohe Expression von TAK1 mit konsekutiv höherer Tumorzellmotilität, vermehrten Gefäßinvasionen und stärker ausgeprägter sowie früherer Metastasierung einhergeht und somit die schlechteren Überlebenschancen von Patienten mit hoher TAK1-Expression in HCCs erklärt. Die Erhöhung der Migrationsaktivität durch TAK1-Überexpression *in vitro* passt zu dieser Hypothese. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TAK1 also auch ursächlich an der Tumorprogression beteiligt ist.

Im hier untersuchten HCC-Kollektiv fiel außerdem eine erhöhte TAK1-Expression im Zusammenhang mit sowohl mikro- (V1) als auch makrovaskulärer (V2) tumoröser Gefäßinvasion auf. Die hier *in vitro* erhobenen Daten lassen an eine vermehrte Zellmotilität bei hoher TAK1-Expression als möglichen Erklärungsmechanismus denken und die vermehrte Gefäßinvasion in Tumoren mit hoher TAK1-Expression könnte den aggressiveren klinischen Verlauf von Tumoren mit hoher TAK1-Expression erklären. Die oben erwähnten durch NF- κ B

induzierten MMPs lösen auch die Basalmembran von Endothelzellen auf und verändern die Extrazellulärmatrix, so dass die Tumorangio-genese begünstigt wird (Xia *et al.*, 2014). In anderen Studien wurde *in vitro* bei experimenteller TAK1-Herrunterregulation über unterschiedliche Effekte je nach Zelllinie und Art der Herunterregulation berichtet (Cheng *et al.*, 2019): Bei Transfektion mit TAK1-siRNA war in Huh7-Zellen die mittels Matrigel-Matrix bestimmte Invasion verringert, in Hep3B- und HA22T-Zellen zeigte sich kein Effekt gegenüber der Kontrolle. Bei Herunterregulation mit dem MAP3K7-Inhibitor (5Z)-7-oxozeaenol war in H22T-Zellen auch eine geringere Invasion zu sehen, in Hep3B dagegen eine stärkere Invasion (Cheng *et al.*, 2019). Die Rolle von TAK1 scheint sich somit in unterschiedlichen Tumorentitäten und unterschiedlichen Zelltypen zu unterscheiden. Zu beachten ist auch, dass es sich bei den Invasionsassays um artefizielle Modelle handelt und diese nicht uneingeschränkt auf Gewebe übertragen werden können.

Auch der Mechanismus einer Apoptosehemmung als Grund für die schlechtere Prognose (Hanahan und Weinberg, 2011) bei hoher TAK1-Expression ist in Betracht zu ziehen. In der Literatur werden TAK1 antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben, indem es die apoptosefördernde Caspase 3 hemmt und über NF- κ B für eine Erhöhung des überlebensfördernden Bcl-2 sorgt (Mukhopadhyay und Lee, 2020), so dass anhand der Literatur eher eine negative Korrelation von TAK1 und aktivierter Caspase 3 zu erwarten gewesen wäre. Im Gegensatz zu dieser Annahme zeigte sich im hier verwendeten HCC-Kollektiv eine positive schwache Korrelation zwischen nukleärer TAK1-Expression und dem Apoptosemarker Caspase 3. Bettermann und Kollegen (Bettermann *et al.*, 2010) haben in Mäusen mit TAK1-defizienten Hepatozyten (TAK1^{LPC-KO}) zahlreiche für Caspase 3 positive Zellen als Indikator für Apoptose beobachtet. Es wird daher angenommen, dass TAK1 die Caspase 3-abhängige Apoptose von Hepatozyten und Cholangiozyten durch NF- κ B-Aktivierung verhindert (Bettermann *et al.*, 2010), indem antiapoptotische, also Caspase-hemmende Proteine wie cFLIP (Chang *et al.*, 2006) und IAPs durch NF- κ B (Wang *et al.*, 1998) aktiviert werden. Tripathi und Kollegen beschrieben die Aktivierung der Caspase 3-abhängigen Apoptose nur durch die ungespleißte Variante. NF- κ B wird dagegen nur durch die kurze TAK1-Variante, wahrscheinlich nicht durch die lange TAK1-Variante aktiviert (Tripathi *et al.*, 2019). Da hier eine Dominanz der kurzen TAK1-Variante im humanen HCC festgestellt wurde, könnte das ein Grund für die weniger starke Apoptose-Hemmung sein. Denkbar ist auch die Einleitung anderer Signalwege je nach TAK1-Isoform-Aktivierung, wobei in vielen Studien nicht zwischen diesen unterschieden wurde. Sicher ist also, dass TAK1 das Zellschicksal reguliert, wobei die genaue Funktion von TAK1 bezüglich Apoptose nicht geklärt ist.

Mit Takinib ist bereits ein selektiver TAK1-Inhibitor beschrieben, der im Sinne einer Apoptose-Induktion als therapeutischer Ansatz in Frage kommt. In *in vitro*-Modellen konnte gezeigt werden, dass Takinib im Mammakarzinom und bei Rheumatoider Arthritis nach TNF- α -

Stimulation Apoptose induziert. Chronisch entzündetes Gewebe sowie das Tumormikromilieu sind besonders reich an TNF- α , so dass sich die proapoptotische Wirkung auf diese Bereiche beschränken könnte und das gesunde Gewebe geschont bliebe (Totzke *et al.*, 2017). Allerdings wäre für die *in vivo*-Anwendung hierfür noch eine Optimierung der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Takinib erforderlich (Scarneo *et al.*, 2020), woran bereits gearbeitet wird (Scarneo *et al.*, 2022).

Im HCC-Kollektiv wurde eine Korrelation zwischen TAK1 und der Ki67-Proliferationsrate nachgewiesen. *In vitro* zeigte sich dagegen kein signifikanter Effekt von TAK1 auf die Proliferationsrate unabhängig von der überexprimierten Isoform. In der bereits erwähnten Studie von Cheng und Kollegen wurde TAK1 in verschiedenen HCC-Zelllinien experimentell herunterreguliert, was mit einer verminderten Proliferation einherging (Cheng *et al.*, 2019). Der gleiche Effekt wurde in Osteosarkom-, Schilddrüsenkarzinom- und Magenkarzinomzelllinien beschrieben (Wei, 2016; Yang *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2015). Bei TAK1-Überexpression in Ovarialkarzinomzellen sowie im Mausmodell *in vivo* war die Proliferationsrate erhöht, bei TAK1-Deletion hingegen erniedrigt (Cai *et al.*, 2014). Als ursächlich wurde hier angenommen, dass TAK1 NF- κ B aktiviert und dieses die Hochregulation von Cyclin D induziert, welches die Zellzyklusprogression und Zellteilung reguliert (Mukhopadhyay und Lee, 2020; Guttridge *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu dieser proliferationsfördernden Rolle von TAK1 wurde auch in TAK1-defizienten Leberparenchymzellen von Mäusen eine vermehrte Proliferation beobachtet. Diese Hyperproliferation ist vermutlich kompensatorisch und durch vermehrten Hepatozytenuntergang und konsekutive regeneratoische Hyperproliferation zu erklären (Bettermann *et al.*, 2010). Denkbar ist auch, dass ein bestimmtes Maß an konstitutiver TAK1-Aktivität erforderlich ist, wahrscheinlich vermittelt durch die kurze, konstitutiv aktive TAK1-Isoform.

In HCCs *in situ* wurde kein Zusammenhang zwischen der nukleären TAK1-Expression und dem Grading festgestellt. Der prognostische Effekt einer hohen TAK1-Expression scheint somit nicht durch eine geringe Differenzierung der stark TAK1-exprimierenden Tumore erklärbar zu sein. In einer zwischenzeitlich veröffentlichten Studie war dagegen die mittels qPCR-Analyse bestimmte TAK1-Expression in gut differenzierten HCCs niedriger als bei mäßiger oder schlechter Differenzierung (Jin *et al.*, 2021). In Prostatakarzinomen war ein Zusammenhang zwischen MAP3K7-Deletion und hohem Gleason-Score nachweisbar (Liu *et al.*, 2007). In verschiedenen Tumorentitäten und Kollektiven wurden also teils heterogene Ergebnisse erzielt.

4.3 Alternatives Spleißen von TAK1

In der Literatur wurden vier Isoformen mit jeweils unterschiedlichen Funktionen beschrieben: Die konstitutiv aktive Isoform TAK1 Δ E12 übt eine zellüberlebensfördernde Funktion aus und soll u.a. über den Mechanismus der EMT wirken (Tripathi *et al.*, 2019). Die nicht konstitutiv aktive Form TAK1FL führt v.a. zur Apoptose durch Spaltung von Caspase 3 (Tripathi *et al.*, 2019; Dempsey *et al.*, 2000). Die beschriebenen unterschiedlichen Wirkungen von TAK1 könnten auch durch das beschriebene alternative Spleißen als posttranskriptionale Modifikation bedingt sein. In den Lysaten aus humanem Gewebe war im Immunblot eine Unterscheidung der TAK1-Isoformen nicht eindeutig. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass anhand der qPCR-Daten überwiegend die kürzere Isoform TAK1 Δ E12 im Leber- und HCC-Gewebe nachweisbar war, so dass das in deutlich geringerer Konzentration vorliegende Protein der vollen Länge möglicherweise im Immunblot nicht eindeutig nachzuweisen war bzw. dann durch die nur wenige Kilodalton kürzere Isoform überstrahlt wurde. Ein Gradientengel könnte hier eine bessere Auftrennung ermöglichen (Walker, 1984). Um die Funktionen der beiden TAK1-Isoformen in HCC-Zellen weiter zu untersuchen, wurden deswegen beide TAK1-Isoformen entweder mit C-terminaler FLAG-Markierung oder ohne Markierung in Huh7-Zellen überexprimiert. Bei der Expressionskontrolle wurde das überexprimierte TAK1 im Gegensatz zum endogenen TAK1 vom TAK1-Antikörper (novusbio, NBP2-67180) nicht erkannt. Möglicherweise behinderte die C-terminale FLAG-Markierung die Detektion durch den TAK1-Antikörper, dessen Epitop laut Herstellerangaben gegen einen Bereich nahe des C-Terminus gerichtet ist. Mittels anti-FLAG-Antikörper konnte die Überexpression jedoch bestätigt werden, so dass der Nachweis der Überexpressionskonstrukte mittels FLAG-Antikörper erfolgte. *In vitro* Daten in Huh7-Zellen zeigen, dass insbesondere die kurze, weniger die lange TAK1-Isoform, mit einer gesteigerten Zellmigration einherging, was zu bereits publizierten Daten anderer Zelltypen passt (Tripathi *et al.*, 2019).

4.4 Intrahepatische Expression und intrazelluläre Lokalisation von TAK1

Im hier verwendeten HCC-Kollektiv korrelierte die TAK1-Expression mit der Expression im nicht-neoplastischen Lebergewebe. Zudem erwies sich eine hohe Expression von TAK1 im Zellkern von HCC-Tumorzellen und nicht-neoplastischen Hepatozyten als prognostisch ungünstiger Faktor. Es ist denkbar, dass die nukleäre Expression von TAK1 das Entzündungsniveau des Patienten im Leber- und Tumorgewebe abbildet. So führen z.B. TNF, IL1, TGF- β , aber auch hohe Fettsäurekonzentrationen oder Lipopolysaccharide aus dem Mikrobiom des Darms wahrscheinlich zur TAK1-Aktivierung im Lebergewebe und fördern möglicherweise die Tumorprogression (Anstee *et al.*, 2019; Roderburg und Luedde, 2014; Ringelhan *et al.*, 2018). Auch eine Regulation der TAK1-vermittelten Entzündungsantwort

durch *Cytoplasmic-Element-Binding* (CPEB) ist beschrieben (Ivshina *et al.*, 2015). Entzündungsreaktionen finden physiologisch im Rahmen der normalen Immunantwort zur Elimination von Pathogenen statt. Tumorzellen können jedoch dem körpereigenen Immunsystem ausweichen und so chronische Entzündungsreaktionen verursachen, die die Tumorentstehung fördern könnten (Grivennikov *et al.*, 2010).

Da TAK1 sowohl von Tumor- als auch von Entzündungszellen gebildet wird, kommt ihm bei der Karzinogenese eine außerordentliche Bedeutung zu (Ajibade *et al.*, 2013): Der TAK1-Signalweg wird durch Zytokine von Entzündungszellen aktiviert und TAK1 nach NF- κ B-Aktivierung im Sinne eines negativen Feedbacks wieder abgebaut, um einer übermäßigen Aktivierung entgegenzuwirken (Mukhopadhyay und Lee, 2020). Reguliert wird dies durch die E3-Ligase ITCH und die Deubiquitinase CYLD, die als Komplex für den TAK1-Abbau sorgen. Ein nicht regelrecht funktionierender Mechanismus kann mit der übermäßigen Zytokin-Produktion von tumorfördernden Makrophagen einhergehen und Krebs verursachen (Ahmed *et al.*, 2011). Eine Quantifizierung der Entzündungszellen und Korrelation mit TAK1 im TMA-Kollektiv könnte weitere Aufschlüsse über die Rolle von TAK1 im inflammatorischen Geschehen geben.

Die separate Analyse von nukleärer und zytoplasmatischer TAK1-Färbung ergab, dass Patienten mit hoher nukleärer TAK1-Expression im HCC früher verstarben als diejenigen mit niedriger nukleärer TAK1-Expression im HCC. Dagegen gab es bei der zytoplasmatischen TAK1-Färbung im HCC keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensdauer der Patienten zwischen hoher und niedriger TAK1-Expression. Eine Induktion von nMet im HCC gegenüber dem umliegenden Lebergewebe wurde nachgewiesen und dadurch eine Aktivierung des TAK1-Promotors vermutet (Tey *et al.*, 2017), so dass nukleäres Met an der Induktion von TAK1 im Zellkern beteiligt sein könnte. Außerdem konnte eine Hochregulation der *long noncoding* RNA (lncRNA) LINC01268 im HCC gezeigt werden, welche MAP3K7 zu aktivieren scheint (Jin *et al.*, 2021). Eine Interaktion von nukleärem TAK1 wurde auch mit dem Protein *SKI like proto-oncogene* (SKIL, auch bekannt als SnoN) beobachtet. SKIL ist ein im Kern lokalisiertes Proto-Onkogen, das den TGF- β -Signalweg Smad-vermittelt hemmt. TAK1 scheint SKIL zu phosphorylieren und dadurch eine Ubiquitinierung und Degradierung von SKIL zu bewirken, so dass die Hemmung des TGF- β -Signalwegs entfällt (Kajino *et al.*, 2007). TGF- β ist unter normalen Bedingungen ein Tumorsuppressor, er wirkt antiproliferativ und proapoptotisch. Im Zuge einer malignen Transformation verändern sich die Rezeptoren, so dass TGF- β hier eine tumorfördernde Rolle annimmt und in Tumoren oftmals eine erhöhte Expression vorgefunden wird (Kubiczkova *et al.*, 2012). Die TGF- β -Aktivierung durch TAK1 führt zu einer abnormalen NF- κ B-Aktivierung (Freudlsperger *et al.*, 2013). Dies könnte das schlechtere Outcome von Patienten mit nukleärer TAK1-Expression im HCC bedingt durch stärkere NF- κ B-Aktivierung erklären.

TAK1 wurde in einigen Publikationen als vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert beschrieben (Jadrich *et al.*, 2003; Stockert *et al.*, 2013). In der immunhistochemischen Färbung von humanem Leber- und HCC-Gewebe im Rahmen dieser Arbeit wurde TAK1 als hauptsächlich nukleär lokalisiertes Protein mit gelegentlicher zusätzlicher Expression im Zytoplasma, teils auch in perinukleärer Lage gesehen. In der Fluoreszenzmikroskopie von Zelllinien überwog die zytoplasmatische Expression. Die nukleäre Lokalisation sollte mit einer weiteren Methode durch Zellfraktionierung und Nachweis im Immunblot verifiziert werden. Die Marker der einzelnen Fraktionen, nämlich PARP für die Zellkernfraktion (Lamarre *et al.*, 1988) und GAPDH für die Zytoplasmafraktion (Mazzola und Sirover, 2003) bestätigten die Funktionstüchtigkeit der Trennungsmethode in aus Zelllinien generierten Lysaten. Die Fraktionierung der HepG2-Zellen gelang möglicherweise aufgrund der Aggregatbildenden Eigenschaft der Zellen (DSMZ, 2021) und damit wohl schlechteren Auftrennung in die unterschiedlichen subzellulären Fraktionen nicht vollständig, so dass jeweils eine starke Bande in der zytosolischen und nur eine schwache Bande in der Zellkernfraktion detektierbar war. Die Lokalisation von TAK1 im Zellkern konnte damit *in vitro* bestätigt und auch die grundsätzliche Machbarkeit der Methode konnte gezeigt werden. Zur Bestätigung der in der Immunhistochemie beobachteten, vorwiegend nukleären Expression von TAK1 *in vivo* wurde zusätzlich eine Fraktionierung aus humanem HCC- und Lebergewebe unternommen. Da die Methode aus tiefgefrorenen humanen Proben keine guten Ergebnisse erzielte, wurde der Versuch einer Fraktionierung aus Frischgewebe unternommen. Grundsätzlich konnte hierbei die Lokalisation von TAK1 im nukleären Kompartiment bestätigt werden, auch wenn die Methodik der Fraktionierung und Detektion mittels Immunblot im humanen Lebergewebe deutliche Schwächen aufwies.

Die im Rahmen dieser Studie beobachtete, vorwiegend nukleäre Lokalisation von TAK1 deckt sich mit einzelnen Studien, in denen TAK1 ebenfalls als nukleär lokalisiert beschrieben wurde: Nach Fraktionierung der aus Keratinozyten abgeleiteten HaCaT-Zelllinie lokalisierte endogenes TAK1 hauptsächlich im Zytosol, nach TGF- β -Stimulation wurden geringe Mengen aber auch in der Zellkernfraktion detektiert (Kajino *et al.*, 2007). Ähnliche Beobachtungen einer nukleären Translokation wurden auch in Lungengewebe gemacht und gingen mit Lungenfibrose einher (Gardner *et al.*, 2012). Auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) wurde immunhistochemisch eine TAK1-Expression sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert (Freudlsperger *et al.*, 2013). In neutrophilen Granulozyten agierte TAK1 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma als IKK-Kinase und beeinflusste dort die Signalkaskaden (Ear *et al.*, 2010). Eine TGF- β -vermittelte Translokation von pTAK1 in den Zellkern von Dünndarmepithelzellen förderte die Kollagensynthese in Myofibroblasten bei Morbus Crohn (Grillo *et al.*, 2015). Weiterhin wurde ein Einfluss auf die nukleäre Translokation von TAK1 durch Wnt-1 beschrieben (Kanei-Ishii *et al.*, 2004). Eine der Ubiquitinierung ähnliche posttranslationale Modifizierung, die sog. Neddylierung (Li *et al.*, 2020), sowie Stimulation

durch TGF- β können ebenfalls die Translokation von TAK1 in den Zellkern herbeiführen (Grillo *et al.*, 2015). Dies lässt vermuten, dass die Translokation von TAK1 auf bestimmte Stimuli hin einen regulierten biologischen Prozess darstellt, dessen Funktion bislang noch nicht hinreichend verstanden wird.

4.5 Fazit und Ausblick

In dieser Promotionsarbeit konnte anhand eines großen Patientenkollektivs von 561 Patienten mit 871 HCCs gezeigt werden, dass TAK1 im HCC im Vergleich zum nicht-neoplastischen Lebergewebe unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie signifikant induziert wurde. In Fernmetastasen konnte eine weitere Induktion im Vergleich mit den entsprechenden Primärtumoren beobachtet werden. Eine hohe TAK1-Expression in den HCCs ging mit einem kürzeren Patientenüberleben einher, wobei TAK1 in der multivariaten Analyse aber keinen unabhängigen Parameter darstellte. TAK1 lokalisierte im umliegenden Leber- und HCC-Gewebe überwiegend im Zellkern und trat vorwiegend in der Spleißvariante TAK1 Δ E12 auf. Bei Überexpression von TAK1 Δ E12 in Huh7-Zellen wurde eine erhöhte Migrationsaktivität verzeichnet, wohingegen eine Überexpression von TAK1FL keinen signifikanten Effekt ausübte.

Da eine hohe TAK1-Expression nicht nur mit einer schlechten Prognose einhergeht, sondern darüber hinaus auch an der Tumorentstehung beteiligt zu sein scheint, wäre langfristig auch ein therapeutischer Ansatz wünschenswert. DNA-Doppelstrangbrüche verursachende genotoxische Substanzen wie ionisierende Strahlung und Chemotherapien induzieren eine TAK1-vermittelte NF- κ B-Aktivierung, die therapeutisch angegangen werden könnte (Colomer *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2010). So veranlasst ATM die ATM-NEMO-Ubc13-Komplexbildung und aktiviert TAK1 (Colomer *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2010). Eine Hemmung von TAK1 könnte also auch eine therapeutische Bedeutung haben. So reduzierte eine TAK1-Hemmung im Adenokarzinom des Pankreas durch den oral aktiven TAK1-Inhibitor LYTAK1 die NF- κ B-Aktivität und sensitivierte die Zellen für Chemotherapeutika (Melisi *et al.*, 2011). Auch für 5(Z)-7Oxozeaenol und weitere Inhibitoren konnte eine TAK1-Hemmung in verschiedenen Tumorentitäten erzielt werden (Santoro *et al.*, 2017). Die Inhibitoren sind jedoch nicht spezifisch für TAK1, so dass weitere Kinasen ebenfalls ausgeschaltet werden (Wu *et al.*, 2013). Nicht zu vernachlässigen sind auch die Zellhomöostase-aufrechterhaltenden Funktionen von TAK1, die bei einer Blockade mit ausgeschaltet werden (Santoro *et al.*, 2017). Eine hepatozytenspezifische TAK1-Deletion in Mäusen führte beispielsweise zu Entzündung und Karzinogenese (Inokuchi *et al.*, 2010; Bettermann *et al.*, 2010). Denkbar wäre eine zeitweise TAK1-Inhibition bei längerfristiger Gabe proapoptotischer Chemotherapeutika zur Therapieresistenzverminderung (Santoro *et al.*, 2017). Eine Hemmung von TAK1, um der

Entwicklung einer Sorafenib-Resistenz entgegenzuwirken, wurde bereits beschrieben (Xia *et al.*, 2021) und lässt an einen möglichen Einsatz in der Therapie des HCCs denken.

5 Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Lebertumor weltweit (*WHO*, 2020). Das HCC kann sich auf dem Boden einer Leberzirrhose im Sinne der sog. Zirrhose-Karzinom-Sequenz entwickeln (Nault *et al.*, 2014). Obwohl das Wissen über die bei der HCC-Entstehung und -Progression beteiligten Signalwege zugenommen hat, sind viele molekulare Mechanismen nicht vollständig geklärt und die Prognose ist oft schwer einzuschätzen. Der weiteren Untersuchung der Karzinogenese und der Identifikation neuer prognostischer Marker kommt daher eine große Bedeutung zu. Die TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) ist an verschiedenen Signalwegen beteiligt. Sie aktiviert u.a. den proinflammatorisch und antiapoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktor NF- κ B (Mihaly *et al.*, 2014). Im Mausmodell wurde TAK1 schon intensiv untersucht. Interessanterweise führte sowohl eine Deletion von TAK1 wie auch eine konstitutive Aktivierung in Hepatozyten zur Entstehung einer Steatohepatitis, zu dysplastischen Knoten und zur Entstehung von HCCs (Roh *et al.*, 2014). Trotz detaillierter experimenteller, an genetisch veränderten Mäusen erhobener Daten, gab es zu Beginn dieser Arbeit keine Daten zur Expression in humanem Gewebe an einem größeren Patientenkollektiv, so dass die Rolle von TAK1 im HCC untersucht werden sollte.

Anhand eines TMAs mit 871 Proben aus HCCs und zugehörigen, nicht-neoplastischen Lebergeweben von 561 Patienten wurde die Expression von TAK1 immunhistochemisch untersucht. TAK1 war im HCC gegenüber dem umliegenden Lebergewebe unabhängig von der zugrundeliegenden Ätiologie signifikant induziert und in HCC-Fernmetastasen lag eine noch stärkere TAK1-Expression als im HCC-Primarius vor. Eine hohe nukleäre TAK1-Expression *in vivo* war u.a. mit einem kürzerem Patientenüberleben, makrovaskulärer Gefäßinvasion und einer erhöhten Proliferationsrate assoziiert, wobei sich TAK1 in der multivariaten COX-Regression nicht als statistisch unabhängiger Marker erwies. Die Induktion von TAK1 im HCC konnte auch mittels Immunblot und nach qPCR auf RNA-Ebene bestätigt werden. Im Lebergewebe und auch im HCC lag TAK1 vorwiegend als Isoform TAK1 Δ E12 vor, die gegenüber dem Protein voller Länge einen Verlust des herausgespleißten Exons 12 aufweist.

Um mögliche Mechanismen für die höhere Aggressivität von HCCs mit hoher TAK1-Expression zu identifizieren, wurden *in vitro* zwei TAK1-Isoformen kloniert und in der humanen Leberzelllinie Huh7 überexprimiert. Der Einfluss der Überexpression dieser beiden Isoformen auf das Migrations- und Proliferationsverhalten wurde untersucht. Nach Überexpression der im Leber- und HCC-Gewebe prädominant vorliegenden Isoform TAK1 Δ E12 wurde eine erhöhte Tumorzellmigration beobachtet, wohingegen die Überexpression der langen Isoform mit allen Exons (TAK1FL) keinen signifikanten Effekt auf die Migration zeigte. Entgegen der *in*

vivo-Daten blieb das Proliferationsverhalten *in vitro* durch die Überexpression beider TAK1-Isoformen unbeeinflusst.

Weiterhin wurde die subzelluläre Lokalisation von TAK1 untersucht. *In vivo* zeigte sich im humanen Leber- und HCC-Gewebe in der Immunhistochemie eine vorwiegend nukleäre TAK1-Expression, während *in vitro* Immunfluoreszenzstudien in der HCC-Zelllinie Huh7 eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von TAK1 demonstrierten. Durch Fraktionierung von Zellen konnte die Expression von TAK1 im nukleären Kompartiment grundsätzlich bestätigt werden.

Die immunhistochemische Analyse der nukleären TAK1-Expression im HCC kann also zur Prognoseabschätzung dienen. Zudem deuten die Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von TAK1 im HCC mit ursächlicher Beteiligung an der Karzinogenese und Tumorprogression hin. Die Rolle von TAK1 bei der HCC-Entstehung und im Rahmen von Therapieresistenz sollte deswegen in weiteren Studien näher beleuchtet werden. Zudem erscheinen weitere Studien mit Fokussierung auf die Isoform-spezifischen Effekte sowie die Identifizierung der genauen subzellulären Lokalisation sinnvoll.

6 Literaturverzeichnis

- Aashaq, S., Batool, A. & Andrabi, K. I. 2019. TAK1 mediates convergence of cellular signals for death and survival. *Apoptosis*, 24, 3-20.
- Abou-Alfa, G. K., Meyer, T., Cheng, A. L., El-Khoueiry, A. B., Rimassa, L., Ryoo, B. Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J. W., Blanc, J. F., Bolondi, L., Klumpen, H. J., Chan, S. L., Zagonel, V., Pressiani, T., Ryu, M. H., Venook, A. P., Hessel, C., Borgman-Hagey, A. E., Schwab, G. & Kelley, R. K. 2018. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 379, 54-63.
- Ahmed, N., Zeng, M., Sinha, I., Polin, L., Wei, W. Z., Rathinam, C., Flavell, R., Massoumi, R. & Venuprasad, K. 2011. The E3 ligase Itch and deubiquitinase Cyld act together to regulate Tak1 and inflammation. *Nat Immunol*, 12, 1176-83.
- Ajibade, A. A., Wang, H. Y. & Wang, R. F. 2013. Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol*, 34, 307-16.
- Anstee, Q. M., Reeves, H. L., Kotsiliti, E., Govaere, O. & Heikenwalder, M. 2019. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16, 411-428.
- Antoury, C., Lopez, R., Zein, N., Stoller, J. K. & Alkhoury, N. 2015. Alpha-1 antitrypsin deficiency and the risk of hepatocellular carcinoma in end-stage liver disease. *World J Hepatol*, 7, 1427-32.
- AWMF, A. D. W. M. F. 2013. *[Diagnosis of and therapy for hepatocellular carcinoma]* [Online]. Erhältlich: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-0033-1355841.pdf> [Zugriff 29. Nov. 2021].
- Bai, Y., Lian, Y., Chen, X., Wu, J., Lai, J., Qiu, F., Zhou, S., Zhu, Z., Tian, Y., Wang, Y., Yang, Y. & Yan, M. 2020. Immunohistochemical Signature Add Prognostic Value in Patients With Early and Intermediate Hepatocellular Carcinoma Underwent Curative Liver Resection. *Front Oncol*, 10, 616263.
- Barry, A. E., Baldeosingh, R., Lamm, R., Patel, K., Zhang, K., Dominguez, D. A., Kirton, K. J., Shah, A. P. & Dang, H. 2020. Hepatic Stellate Cells and Hepatocarcinogenesis. *Front Cell Dev Biol*, 8, 709.
- Bettermann, K., Vucur, M., Haybaeck, J., Koppe, C., Janssen, J., Heymann, F., Weber, A., Weiskirchen, R., Liedtke, C., Gassler, N., Muller, M., De Vos, R., Wolf, M. J., Boege, Y., Seleznik, G. M., Zeller, N., Erny, D., Fuchs, T., Zoller, S., Cairo, S., Buendia, M. A., Prinz, M., Akira, S., Tacke, F., Heikenwalder, M., Trautwein, C. & Luedde, T. 2010. TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell*, 17, 481-96.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- Blank, F., Langer, Lehner 2014. Pathologie in Frage und Antwort. In: ELSEVIER (ed.).
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Broelsch, G., Gerken. 2003. *Hepatozelluläres Karzinom* [Online]. Chirurgische Gastroenterologie interdisziplinär. Erhältlich: <https://www.karger.com/Article/Pdf/74013> [Zugriff 4. Jun. 2021].
- Brown, K., Vial, S. C., Dedi, N., Long, J. M., Dunster, N. J. & Cheetham, G. M. 2005. Structural basis for the interaction of TAK1 kinase with its activating protein TAB1. *J Mol Biol*, 354, 1013-20.
- Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y. H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P. J., Song, T., Bronowicki, J. P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A. L., Llovet, J. M., Finn, R. S., Lelover, M. A., Baumhauer, A., Meinhardt, G. & Han, G. 2017. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 389, 56-66.
- Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B. V., Györfy, B., Schmitt, W. D., Darb-Esfahani, S. & Denkert, C. 2012. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One*, 7, e51862.

- Burt, A. D., Alves, V., Bedossa, P., Clouston, A., Guido, M., Hübscher, S., Kakar, S., Ng, I., Park, Y. N., Reeves, H., Wyatt, J., Yeh, M. M. & Ellis, D. W. 2018. Data set for the reporting of intrahepatic cholangiocarcinoma, perihilar cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma: recommendations from the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Histopathology*, 73, 369-385.
- Cai, P. C., Shi, L., Liu, V. W., Tang, H. W., Liu, I. J., Leung, T. H., Chan, K. K., Yam, J. W., Yao, K. M., Ngan, H. Y. & Chan, D. W. 2014. Elevated TAK1 augments tumor growth and metastatic capacities of ovarian cancer cells through activation of NF- κ B signaling. *Oncotarget*, 5, 7549-62.
- Calderaro, J., Couchy, G., Imbeaud, S., Amaddeo, G., Letouzé, E., Blanc, J. F., Laurent, C., Hajji, Y., Azoulay, D., Bioulac-Sage, P., Nault, J. C. & Zucman-Rossi, J. 2017. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *J Hepatol*, 67, 727-738.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y. C. & Karin, M. 2006. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell*, 124, 601-13.
- Chaudhari, V. A., Khobragade, K., Bhandare, M. & Shrikhande, S. V. 2018. Management of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Chin Clin Oncol*, 7, 51.
- Chen ly, A.-V. D. 2021. *Hepatocellular carcinoma overview* [Online]. Pathology Outlines. Erhältlich: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/livertumorHCC.html> [Zugriff 28. Feb. 2021].
- Cheng, J. S., Tsai, W. L., Liu, P. F., Goan, Y. G., Lin, C. W., Tseng, H. H., Lee, C. H. & Shu, C. W. 2019. The MAP3K7-mTOR Axis Promotes the Proliferation and Malignancy of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Front Oncol*, 9, 474.
- Child, C. G. & Turcotte, J. G. 1964. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg*, 1, 1-85.
- Chiu, Y. H., Zhao, M. & Chen, Z. J. 2009. Ubiquitin in NF-kappaB signaling. *Chem Rev*, 109, 1549-60.
- Colomer, C., Margalef, P., Villanueva, A., Vert, A., Pecharroman, I., Sole, L., Gonzalez-Farre, M., Alonso, J., Montagut, C., Martinez-Iniesta, M., Bertran, J., Borrás, E., Iglesias, M., Sabido, E., Bigas, A., Boulton, S. J. & Espinosa, L. 2019. IKK α Kinase Regulates the DNA Damage Response and Drives Chemo-resistance in Cancer. *Mol Cell*.
- Cordas Dos Santos, D. M., Eilers, J., Sosa Vizcaino, A., Orlova, E., Zimmermann, M., Stanulla, M., Schrappe, M., Börner, K., Grimm, D., Muckenthaler, M. U., Kulozik, A. E. & Kunz, J. B. 2018. MAP3K7 is recurrently deleted in pediatric T-lymphoblastic leukemia and affects cell proliferation independently of NF- κ B. *BMC Cancer*, 18, 663.
- Dai, L., Aye Thu, C., Liu, X. Y., Xi, J. & Cheung, P. C. 2012. TAK1, more than just innate immunity. *IUBMB Life*, 64, 825-34.
- Dasari, B. V., Kamarajah, S. K., Hodson, J., Pawlik, T. M., Vauthey, J. N., Ma, Y. T., Punia, P., Coldham, C., Abradelo, M., Roberts, K. J., Marudanayagam, R., Sutcliffe, R. P., Muiersan, P., Mirza, D. F. & Isaac, J. 2020. Development and validation of a risk score to predict the overall survival following surgical resection of hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver. *HPB (Oxford)*, 22, 383-390.
- Dhanasekaran, R., Bandoh, S. & Roberts, L. R. 2016. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Res*, 5.
- Di Tommaso, L., Destro, A., Seok, J. Y., Balladore, E., Terracciano, L., Sangiovanni, A., Iavarone, M., Colombo, M., Jang, J. J., Yu, E., Jin, S. Y., Morengi, E., Park, Y. N. & Roncalli, M. 2009. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 50, 746-54.
- Di Tommaso, L., Spadaccini, M., Donadon, M., Personeni, N., Elamin, A., Aghemo, A. & Lleo, A. 2019. Role of liver biopsy in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 25, 6041-6052.
- Dimitroulis, D., Damaskos, C., Valsami, S., Davakis, S., Garmpis, N., Spartalis, E., Athanasiou, A., Moris, D., Sakellariou, S., Kykalos, S., Tsourouflis, G., Garmpi, A., Delladetsima, I., Kontzoglou, K. & Kouraklis, G. 2017. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. *World J Gastroenterol*, 23, 5282-5294.

- DSMZ. 2021. *HEP-G2* [Online]. DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Erhältlich: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-180> [Zugriff 15. Mai 2021].
- Du Prel, J. B., Rohrig, B., Hommel, G. & Blettner, M. 2010. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 343-8.
- Durnez, A., Verslype, C., Nevens, F., Fevery, J., Aerts, R., Pirenne, J., Lesaffre, E., Libbrecht, L., Desmet, V. & Roskams, T. 2006. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*, 49, 138-51.
- Ear, T., Fortin, C. F., Simard, F. A. & McDonald, P. P. 2010. Constitutive association of TGF-beta-activated kinase 1 with the I kappa B kinase complex in the nucleus and cytoplasm of human neutrophils and its impact on downstream processes. *J Immunol*, 184, 3897-906.
- Easl 2018. *EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 69, 182-236.
- Edmondson, H. A. & Steiner, P. E. 1954. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*, 7, 462-503.
- Egeblad, M. & Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 161-74.
- El-Serag, H. B. 2011. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 365, 1118-27.
- Entschladen, F., Drell, T. L. T., Lang, K., Joseph, J. & Zaenker, K. S. 2004. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol*, 5, 254-8.
- Farazi, P. A. & Depinho, R. A. 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer*, 6, 674-87.
- Finn, R. S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P. R., Ducreux, M., Kim, T. Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A. O., Li, D., Verret, W., Xu, D. Z., Hernandez, S., Liu, J., Huang, C., Mulla, S., Wang, Y., Lim, H. Y., Zhu, A. X. & Cheng, A. L. 2020. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*, 382, 1894-1905.
- Freudlsperger, C., Bian, Y., Contag Wise, S., Burnett, J., Coupar, J., Yang, X., Chen, Z. & Van Waes, C. 2013. TGF-beta and NF-kB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene*, 32, 1549-59.
- Gallagher, S. R. 2006. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 10, Unit 10.2A.
- Gardner, A., Fisher, A. J., Richter, C., Johnson, G. E., Moisey, E. J., Brodlie, M., Ward, C., Krippner-Heidenreich, A., Mann, D. A. & Borthwick, L. A. 2012. The critical role of TAK1 in accentuated epithelial to mesenchymal transition in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Pathol*, 180, 2293-308.
- Gasparovic, A. C., Milkovic, L., Sunjic, S. B. & Zarkovic, N. 2017. Cancer growth regulation by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med*, 111, 226-234.
- Genecards. 2021. *MAP3K7 Gene (Protein Coding), Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7* [Online]. Erhältlich: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAP3K7#summaries> [Zugriff 02. April 2021].
- Giannelli, G., Koudelkova, P., Dituri, F. & Mikulits, W. 2016. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 65, 798-808.
- Grillo, A. R., Scarpa, M., D'inca, R., Brun, P., Scarpa, M., Porzionato, A., De Caro, R., Martines, D., Buda, A., Angriman, I., Palu, G., Sturniolo, G. C. & Castagliuolo, I. 2015. TAK1 is a key modulator of the profibrogenic phenotype of human ileal myofibroblasts in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 309, G443-54.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140, 883-99.
- Guttridge, D. C., Albanese, C., Reuther, J. Y., Pestell, R. G. & Baldwin, A. S., Jr. 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*, 19, 5785-99.

- Hameed, B., Mehta, N., Sapisochin, G., Roberts, J. P. & Yao, F. Y. 2014. Alpha-fetoprotein level > 1000 ng/mL as an exclusion criterion for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma meeting the Milan criteria. *Liver Transpl*, 20, 945-51.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Higgins, H. & Berger, D. L. 2006. RFA for liver tumors: does it really work? *Oncologist*, 11, 801-8.
- Hirata, Y., Takahashi, M., Morishita, T., Noguchi, T. & Matsuzawa, A. 2017. Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex. *Int J Mol Sci*, 18.
- Hollebecque, A., Cattan, S., Romano, O., Sergent, G., Mourad, A., Louvet, A., Dharancy, S., Boleslawski, E., Truant, S., Pruvot, F. R., Hebbard, M., Ernst, O. & Mathurin, P. 2011. Safety and efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma: the impact of the Child-Pugh score. *Aliment Pharmacol Ther*, 34, 1193-201.
- In Der Stroth, L., Tharehalli, U., Günes, C. & Lechel, A. 2020. Telomeres and Telomerase in the Development of Liver Cancer. *Cancers (Basel)*, 12.
- Inagaki, M., Omori, E., Kim, J. Y., Komatsu, Y., Scott, G., Ray, M. K., Yamada, G., Matsumoto, K., Mishina, Y. & Ninomiya-Tsuji, J. 2008. TAK1-binding protein 1, TAB1, mediates osmotic stress-induced TAK1 activation but is dispensable for TAK1-mediated cytokine signaling. *J Biol Chem*, 283, 33080-6.
- Inokuchi, S., Aoyama, T., Miura, K., Osterreicher, C. H., Kodama, Y., Miyai, K., Akira, S., Brenner, D. A. & Seki, E. 2010. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 844-9.
- Ivshina, M., Alexandrov, I. M., Vertii, A., Doxsey, S. & Richter, J. D. 2015. CPEB regulation of TAK1 synthesis mediates cytokine production and the inflammatory immune response. *Mol Cell Biol*, 35, 610-8.
- Jadrich, J. L., O'connor, M. B. & Coucouvanis, E. 2003. Expression of TAK1, a mediator of TGF-beta and BMP signaling, during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns*, 3, 131-4.
- Jin, X., Fu, W., Li, D., Wang, N., Chen, J., Zeng, Z., Guo, J., Liu, H., Zhong, X., Peng, H., Yu, X., Sun, J., Zhang, X., Wang, X., Xu, B., Lin, Y., Liu, J., Kutter, C. & Li, Y. 2021. High Expression of LINC01268 is Positively Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression via Regulating MAP3K7. *Onco Targets Ther*, 14, 1753-1769.
- Kajino, T., Omori, E., Ishii, S., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. 2007. TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *J Biol Chem*, 282, 9475-81.
- Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D. L., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. 2006. Protein phosphatase 6 down-regulates TAK1 kinase activation in the IL-1 signaling pathway. *J Biol Chem*, 281, 39891-6.
- Kanei-Ishii, C., Ninomiya-Tsuji, J., Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., Matsumoto, K. & Ishii, S. 2004. Wnt-1 signal induces phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev*, 18, 816-29.
- Kew, M. C., Dos Santos, H. A. & Sherlock, S. 1971. Diagnosis of primary cancer of the liver. *Br Med J*, 4, 408-11.
- Khalili, K., Kim, T. K., Jang, H. J., Haider, M. A., Khan, L., Guindi, M. & Sherman, M. 2011. Optimization of imaging diagnosis of 1-2 cm hepatocellular carcinoma: an analysis of diagnostic performance and resource utilization. *J Hepatol*, 54, 723-8.
- Kirstein, M. M. & Wirth, T. C. 2020. [Multimodal treatment of hepatocellular carcinoma]. *Internist (Berl)*, 61, 164-169.
- Kishimoto, K., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. 2000. TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem*, 275, 7359-64.
- Kobayashi, M., Hosaka, T., Ikeda, K., Seko, Y., Kawamura, Y., Sezaki, H., Akuta, N., Suzuki, F., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y. & Kumada, H. 2011. Highly sensitive AFP-L3% assay is useful for predicting recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment pre- and postoperatively. *Hepatol Res*, 41, 1036-45.

- Kolligs, F. T., Bilbao, J. I., Jakobs, T., Iñarrairaegui, M., Nagel, J. M., Rodriguez, M., Haug, A., D'Avola, D., Op Den Winkel, M., Martinez-Cuesta, A., Trumm, C., Benito, A., Tatsch, K., Zech, C. J., Hoffmann, R. T. & Sangro, B. 2015. Pilot randomized trial of selective internal radiation therapy vs. chemoembolization in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int*, 35, 1715-21.
- Krebsgesellschaft, D. 2021. *Therapie von Leberkrebs* [Online]. Erhältlich: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/leberkrebs/therapie.html> [Zugriff 10. April 2021].
- Kudo, M. 2018. Management of Hepatocellular Carcinoma in Japan as a World-Leading Model. *Liver Cancer*, 7, 134-147.
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., Tamai, T., Ren, M. & Cheng, A. L. 2018. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 391, 1163-1173.
- Kyriakis, J. M. & Avruch, J. 2012. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*, 92, 689-737.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lamarre, D., Talbot, B., De Murcia, G., Laplante, C., Leduc, Y., Mazen, A. & Poirier, G. G. 1988. Structural and functional analysis of poly(ADP ribose) polymerase: an immunological study. *Biochim Biophys Acta*, 950, 147-60.
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 178-96.
- Lee, J. S., Adler, L., Karathia, H., Carmel, N., Rabinovich, S., Auslander, N., Keshet, R., Stettner, N., Silberman, A., Agemy, L., Helbling, D., Eilam, R., Sun, Q., Brandis, A., Malitsky, S., Itkin, M., Weiss, H., Pinto, S., Kalaora, S., Levy, R., Barnea, E., Admon, A., Dimmock, D., Stern-Ginossar, N., Scherz, A., Nagamani, S. C. S., Unda, M., Wilson, D. M., 3rd, Elhasid, R., Carracedo, A., Samuels, Y., Hannenhalli, S., Ruppin, E. & Erez, A. 2018. Urea Cycle Dysregulation Generates Clinically Relevant Genomic and Biochemical Signatures. *Cell*, 174, 1559-1570.e22.
- Lee, Y. J., Lee, J. M., Lee, J. S., Lee, H. Y., Park, B. H., Kim, Y. H., Han, J. K. & Choi, B. I. 2015. Hepatocellular carcinoma: diagnostic performance of multidetector CT and MR imaging—a systematic review and meta-analysis. *Radiology*, 275, 97-109.
- Leitlinienprogramm Onkologie, D. K., Deutsche Krebshilfe, AWMF 2022. Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome, Langversion 3.0, Februar 2021, AWMF Registernummer: 032/-053OL, .
- Li, S., Fang, W., Cui, Y., Shi, H., Chen, J., Li, L., Zhang, L. & Zhang, X. 2020. Neddylation promotes protein translocation between the cytoplasm and nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, 529, 991-997.
- Lim, J. S., Park, S. H. & Jang, K. L. 2012. Hepatitis C virus Core protein overcomes stress-induced premature senescence by down-regulating p16 expression via DNA methylation. *Cancer Lett*, 321, 154-61.
- Lin, P., Niu, W., Peng, C., Zhang, Z. & Niu, J. 2015. The role of TAK1 expression in thyroid cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 14449-56.
- Liu, W., Chang, B. L., Cramer, S., Koty, P. P., Li, T., Sun, J., Turner, A. R., Von Kap-Herr, C., Bobby, P., Rao, J., Zheng, S. L., Isaacs, W. B. & Xu, J. 2007. Deletion of a small consensus region at 6q15, including the MAP3K7 gene, is significantly associated with high-grade prostate cancers. *Clin Cancer Res*, 13, 5028-33.
- Llovet, J. M., Brú, C. & Bruix, J. 1999. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis*, 19, 329-38.
- Llovet, J. M., Bruix, J., Fuster, J., Castells, A., Garcia-Valdecasas, J. C., Grande, L., Franca, A., Brú, C., Navasa, M., Ayuso, M. C., Solé, M., Real, M. I., Vilana, R., Rimola, A., Visa, J. & Rodés, J. 1998. Liver transplantation for small hepatocellular carcinoma: the tumor-node-metastasis classification does not have prognostic power. *Hepatology*, 27, 1572-7.

- Llovet, J. M., Peña, C. E., Lathia, C. D., Shan, M., Meinhardt, G. & Bruix, J. 2012. Plasma biomarkers as predictors of outcome in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 18, 2290-300.
- Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., De Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Häussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D. & Bruix, J. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359, 378-90.
- Lokuhetty, D. 2019. *WHO Classification of Tumours*, WHO: Geneva, Switzerland.
- Maeda, S. 2010. NF- κ B, JNK, and TLR Signaling Pathways in Hepatocarcinogenesis. *Gastroenterol Res Pract*, 2010, 367694.
- Maeda, S., Hikiba, Y., Sakamoto, K., Nakagawa, H., Hirata, Y., Hayakawa, Y., Yanai, A., Ogura, K., Karin, M. & Omata, M. 2009. I κ B kinase β /nuclear factor- κ B activation controls the development of liver metastasis by way of interleukin-6 expression. *Hepatology*, 50, 1851-60.
- Marrero, J. A., Feng, Z., Wang, Y., Nguyen, M. H., Befeler, A. S., Roberts, L. R., Reddy, K. R., Harnois, D., Llovet, J. M., Normolle, D., Dalhgren, J., Chia, D., Lok, A. S., Wagner, P. D., Srivastava, S. & Schwartz, M. 2009. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 137, 110-8.
- Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A. & Gennari, L. 1996. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med*, 334, 693-9.
- Mazzola, J. L. & Sirover, M. A. 2003. Subcellular localization of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is independent of its glycolytic function. *Biochim Biophys Acta*, 1622, 50-6.
- Mcdonell, M. W., Simon, M. N. & Studier, F. W. 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*, 110, 119-46.
- Melisi, D., Xia, Q., Paradiso, G., Ling, J., Moccia, T., Carbone, C., Budillon, A., Abbruzzese, J. L. & Chiao, P. J. 2011. Modulation of pancreatic cancer chemoresistance by inhibition of TAK1. *J Natl Cancer Inst*, 103, 1190-204.
- Mihaly, S. R., Ninomiya-Tsuji, J. & Morioka, S. 2014. TAK1 control of cell death. *Cell Death And Differentiation*, 21, 1667.
- Mínguez, B. & Lachenmayer, A. 2011. Diagnostic and prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *Dis Markers*, 31, 181-90.
- Mukhopadhyay, H. & Lee, N. Y. 2020. Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer. *Oncogene*, 39, 1402-1413.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17-27.
- Nagtegaal, I. D., Odze, R. D., Klimstra, D., Paradis, V., Rugge, M., Schirmacher, P., Washington, K. M., Carneiro, F. & Cree, I. A. 2020. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*, 76, 182-188.
- Nault, J. C., Calderaro, J., Di Tommaso, L., Balabaud, C., Zafrani, E. S., Bioulac-Sage, P., Roncalli, M. & Zucman-Rossi, J. 2014. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology*, 60, 1983-92.
- Neoplasia, I. C. G. F. H. 2009. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology*, 49, 658-64.
- Oken, M. M., Creech, R. H., Tormey, D. C., Horton, J., Davis, T. E., Mcfadden, E. T. & Carbone, P. P. 1982. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5, 649-55.
- Parikh, N. D., Waljee, A. K. & Singal, A. G. 2015. Downstaging hepatocellular carcinoma: A systematic review and pooled analysis. *Liver Transpl*, 21, 1142-52.

- Park, J. W., Chen, M., Colombo, M., Roberts, L. R., Schwartz, M., Chen, P. J., Kudo, M., Johnson, P., Wagner, S., Orsini, L. S. & Sherman, M. 2015. Global patterns of hepatocellular carcinoma management from diagnosis to death: the BRIDGE Study. *Liver Int*, 35, 2155-66.
- Party, I. W. 1995. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*, 22, 983-93.
- Pathak, S., Borodkin, V. S., Albarbarawi, O., Campbell, D. G., Ibrahim, A. & Van Aalten, D. M. 2012. O-GlcNAcylation of TAB1 modulates TAK1-mediated cytokine release. *Embo j*, 31, 1394-404.
- Perkins, N. D. 2012. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. *Nat Rev Cancer*, 12, 121-32.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. & Ben-Neriah, Y. 2004. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431, 461-6.
- Product Datasheet 2021. TAK1 Antibody (JM73-19).
- Qian, Q., Li, Y., Fu, J., Leng, D., Dong, Z., Shi, J., Shi, H., Cao, D., Cheng, X., Hu, Y., Luo, Q., Hu, M., Ran, Y., Tang, H., Liu, H. & Liu, J. 2022. Switch-associated protein 70 protects against nonalcoholic fatty liver disease through suppression of TAK1. *Hepatology*, 75, 1507-1522.
- Rastogi, A. 2018. Changing role of histopathology in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 24, 4000-4013.
- Raul S. Gonzalez, M. D., Debra Zynger, M.D., Monika Vyas, M.D. 8 March 2022. Liver & intrahepatic bile ducts. *Pathology Outlines*.
- Rcoreteam 2020. R. A Language and Environment for Statistical Computing. . *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*.
- Reinard, T. 2010. Molekularbiologische Methoden : 41 Tab.n. *UTB*. Stuttgart.
- Remmele, W. & Stegner, H. E. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8, 138-40.
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- Renne, S. L., Woo, H. Y., Allegra, S., Rudini, N., Yano, H., Donadon, M., Viganò, L., Akiba, J., Lee, H. S., Rhee, H., Park, Y. N., Roncalli, M. & Di Tommaso, L. 2020. Vessels Encapsulating Tumor Clusters (VETC) Is a Powerful Predictor of Aggressive Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 71, 183-195.
- Ridder, D. A., Schindeldecker, M., Weinmann, A., Berndt, K., Urbansky, L., Witzel, H. R., Heinrich, S., Roth, W., & Straub, B. K. 2021. Key Enzymes in Pyrimidine Synthesis, CAD and CPS1, Predict Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)*, 13(4), 744.
- Ridder, D. A., Urbansky, L. L., Witzel, H. R., Schindeldecker, M., Weinmann, A., Berndt, K., Gerber, T. S., Köhler, B. C., Nichetti, F., Ludt, A., Gehrke, N., Schattenberg, J. M., Heinrich, S., Roth, W. & Straub, B. K. 2022. Transforming Growth Factor- β Activated Kinase 1 (Tak1) Is Activated in Hepatocellular Carcinoma, Mediates Tumor Progression, and Predicts Unfavorable Outcome. *Cancers (Basel)*, 14.
- Ringelhan, M., Pfister, D., O'connor, T., Pikarsky, E. & Heikenwalder, M. 2018. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol*, 19, 222-232.
- Roderburg, C. & Luedde, T. 2014. The role of the gut microbiome in the development and progression of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes*, 5, 441-5.
- Roh, Y. S., Song, J. & Seki, E. 2014. TAK1 regulates hepatic cell survival and carcinogenesis. *J Gastroenterol*, 49, 185-94.
- Safina, A., Ren, M. Q., Vandette, E. & Bakin, A. V. 2008. TAK1 is required for TGF- β 1-mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and metastasis. *Oncogene*, 27, 1198-207.
- Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J. & Sugita, T. 2000. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett*, 474, 141-5.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- Santoro, R., Carbone, C., Piro, G., Chiao, P. J. & Melisi, D. 2017. TAK-ing aim at chemoresistance: The emerging role of MAP3K7 as a target for cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 33-35, 36-42.
- Scarneo, S., Hughes, P., Freeze, R., Yang, K., Totzke, J. & Haystead, T. 2022. Development and Efficacy of an Orally Bioavailable Selective TAK1 Inhibitor for the Treatment of Inflammatory Arthritis. *ACS Chem Biol*, 17, 536-544.
- Scarneo, S. A., Yang, K. W., Roques, J. R., Dai, A., Eibschutz, L. S., Hughes, P. & Haystead, T. a. J. 2020. TAK1 regulates the tumor microenvironment through inflammatory, angiogenetic and apoptotic signaling cascades. *Oncotarget*, 11, 1961-1970.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28, 815-20.
- Shim, J. H., Xiao, C., Paschal, A. E., Bailey, S. T., Rao, P., Hayden, M. S., Lee, K. Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K. & Ghosh, S. 2005. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev*, 19, 2668-81.
- Stockert, J., Wolf, A., Kaddatz, K., Schnitzer, E., Finkernagel, F., Meissner, W., Müller-Brüsselbach, S., Kracht, M. & Müller, R. 2013. Regulation of TAK1/TAB1-mediated IL-1 β signaling by cytoplasmic PPAR β/δ . *PLoS One*, 8, e63011.
- Stuart, K. E. 2022. Systemic treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *UpToDate*.
- Tang, Y. 2009. *MAP3K7 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7)* [Online]. Erhältlich: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MAP3K7.html [Zugriff 18. April 2021].
- Taniguchi, K. & Karin, M. 2018. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*, 18, 309-324.
- Tannapfel, A. K., G. 2020. *Pathologie: Leber, Gallenwege, Pankreas*.
- Tey, S. K., Tse, E. Y. T., Mao, X., Ko, F. C. F., Wong, A. S. T., Lo, R. C., Ng, I. O. & Yam, J. W. P. 2017. Nuclear Met promotes hepatocellular carcinoma tumorigenesis and metastasis by upregulation of TAK1 and activation of NF-kappaB pathway. *Cancer Lett*, 411, 150-161.
- The Cancer Genome Atlas Research Network 2017. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*, 169, 1327-1341.e23.
- ThermoFisher, M. 2010. *NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual* [Online]. Erhältlich: <http://tools.thermoFisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf> [Zugriff 19. Okt. 2019].
- Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-42.
- Totzke, J., Gurbani, D., Raphemot, R., Hughes, P. F., Bodoor, K., Carlson, D. A., Loiseau, D. R., Bera, A. K., Eibschutz, L. S., Perkins, M. M., Eubanks, A. L., Campbell, P. L., Fox, D. A., Westover, K. D., Haystead, T. a. J. & Derbyshire, E. R. 2017. Takinib, a Selective TAK1 Inhibitor, Broadens the Therapeutic Efficacy of TNF- α Inhibition for Cancer and Autoimmune Disease. *Cell Chem Biol*, 24, 1029-1039.e7.
- Tripathi, V., Shin, J. H., Stuelten, C. H. & Zhang, Y. E. 2019. TGF-beta-induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance. *Oncogene*, 38, 3185-3200.
- Tzartzeva, K., Obi, J., Rich, N. E., Parikh, N. D., Marrero, J. A., Yopp, A., Waljee, A. K. & Singal, A. G. 2018. Surveillance Imaging and Alpha Fetoprotein for Early Detection of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Cirrhosis: A Meta-analysis. *Gastroenterology*, 154, 1706-1718.e1.
- Uka, K., Aikata, H., Takaki, S., Shirakawa, H., Jeong, S. C., Yamashina, K., Hiramatsu, A., Kodama, H., Takahashi, S. & Chayama, K. 2007. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 13, 414-20.
- Villanueva, A., Newell, P. & Hoshida, Y. 2010. Inherited hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 24, 725-34.
- Vilstrup, H., Amodio, P., Bajaj, J., Cordoba, J., Ferenci, P., Mullen, K. D., Weissenborn, K. & Wong, P. 2014. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice

- Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*, 60, 715-35.
- Vucur, M., Roderburg, C., Bettermann, K., Tacke, F., Heikenwalder, M., Trautwein, C. & Luedde, T. 2010. Mouse models of hepatocarcinogenesis: what can we learn for the prevention of human hepatocellular carcinoma? *Oncotarget*, 1, 373-8.
- Walker, J. M. 1984. Gradient SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 1, 57-61.
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. & Baldwin, A. S., Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-3.
- Wei, Y. Z., R.; Wang, Q.; Fu, B.; Jing, W.; Wang H. 2016. Expression and function of TAK1 in osteosarcoma tissue. *Int J Clin Exp Med* 2016;9(6):10891-10898.
- Wen, J., Hu, Y., Luo, K. J., Yang, H., Zhang, S. S. & Fu, J. H. 2013. Positive transforming growth factor- β activated kinase-1 expression has an unfavorable impact on survival in T3N1-3M0 esophageal squamous cell carcinomas. *Ann Thorac Surg*, 95, 285-90.
- WHO. 2020. *Liver fact sheet* [Online]. Erhältlich: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf> [Zugriff 22. Okt. 2020].
- Wu, J., Powell, F., Larsen, N. A., Lai, Z., Byth, K. F., Read, J., Gu, R. F., Roth, M., Toader, D., Saeh, J. C. & Chen, H. 2013. Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (5Z)-7-Oxozeaenol. *ACS Chem Biol*, 8, 643-50.
- Wu, Z. H., Wong, E. T., Shi, Y., Niu, J., Chen, Z., Miyamoto, S. & Tergaonkar, V. 2010. ATM- and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Mol Cell*, 40, 75-86.
- Xia, L., Tan, S., Zhou, Y., Lin, J., Wang, H., Oyang, L., Tian, Y., Liu, L., Su, M., Wang, H., Cao, D. & Liao, Q. 2018. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther*, 11, 2063-2073.
- Xia, S., Ji, L., Tao, L., Pan, Y., Lin, Z., Wan, Z., Pan, H., Zhao, J., Cai, L., Xu, J. & Cai, X. 2021. TAK1 Is a Novel Target in Hepatocellular Carcinoma and Contributes to Sorafenib Resistance. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 12, 1121-1143.
- Xia, Y., Shen, S. & Verma, I. M. 2014. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*, 2, 823-30.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. & Matsumoto, K. 1995. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, 270, 2008-11.
- Yang, J. D., Hainaut, P., Gores, G. J., Amadou, A., Plymoth, A. & Roberts, L. R. 2019. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16, 589-604.
- Yang, L., Inokuchi, S., Roh, Y. S., Song, J., Loomba, R., Park, E. J. & Seki, E. 2013. Transforming growth factor- β signaling in hepatocytes promotes hepatic fibrosis and carcinogenesis in mice with hepatocyte-specific deletion of TAK1. *Gastroenterology*, 144, 1042-1054.e4.
- Yang, Y., Qiu, Y., Tang, M., Wu, Z., Hu, W. & Chen, C. 2017. Expression and function of transforming growth factor- β -activated protein kinase 1 in gastric cancer. *Mol Med Rep*, 16, 3103-3110.
- Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H. & Hu, H. 2020. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther*, 5, 209.
- Zander H, M.-E. S., Zwiewka M, Groß S, Van Zandbergen G, Engelbergs J. 2020. Checkpointinhibitoren in der Tumortherapie [Checkpoint inhibitors for cancer therapy]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*.
- Zhou, Y., Lei, X., Wu, L., Wu, X., Xu, D. & Li, B. 2014. Outcomes of hepatectomy for noncirrhotic hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Surg Oncol*, 23, 236-42.
- Zucman-Rossi, J., Benhamouche, S., Godard, C., Boyault, S., Grimber, G., Balabaud, C., Cunha, A. S., Bioulac-Sage, P. & Perret, C. 2007. Differential effects of inactivated Axin1 and activated beta-catenin mutations in human hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 26, 774-80.

7 Anhang

7.1 Vektoren

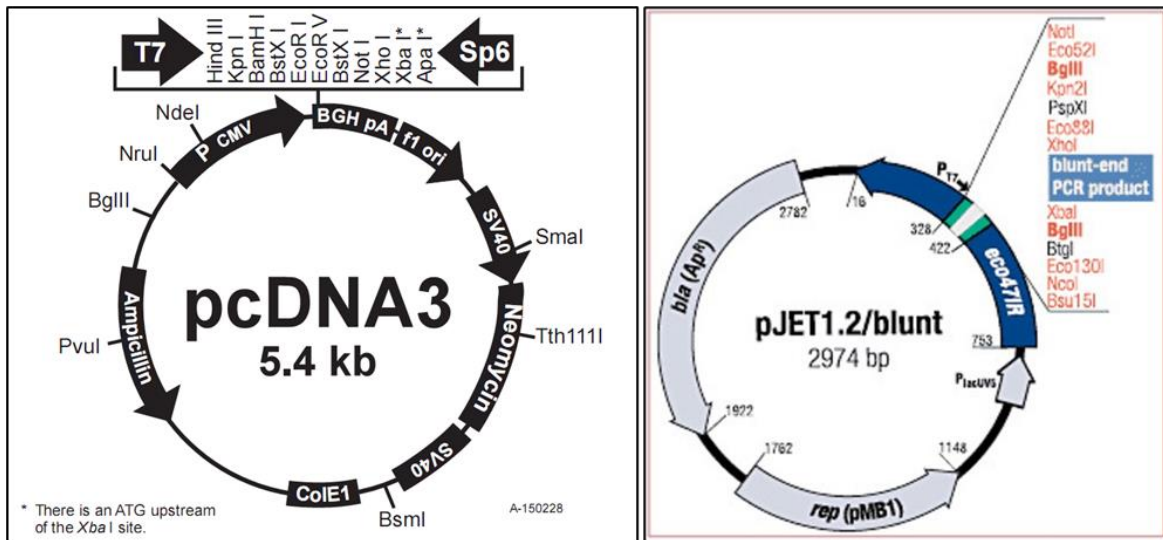


Abb. 7.1: Vektorkarten von pcDNA3 und PJET.

Quellen: pcDNA3: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/figures/k123_2.jpg-650.jpg

pJET: <https://www.lifescience-market.com/images/pCDNA3.0.png>

7.2 Kollektiv

Tab. 7.1: Klinische und pathologische Daten in Bezug auf die TAK1-Expression

Merkmal	niedrige nukleäre TAK1-Expression	hohe nukleäre TAK1-Expression	p-Wert ²	niedrige zytoplasmatische TAK1-Expression	hohe zytoplasmatische TAK1-Expression	p-Wert ²
	N = 336 (64%) ¹	N = 192 (36%) ¹		N = 455 (86%) ¹	N = 73 (14%) ¹	
mittleres Alter [Jahre]	62,6 (77,5-69,9)	66,3 (59,2-73,2)	<0,001	65,2 (56,6-71-4)	60,4 (55,5-66,7)	0,007
max. Durchmesser [mm]	36 (24-68)	50 (30-98)	<0,001	41 (25-80)	38 (26-92)	>0,9
Geschlecht			0,12			0,1
männlich	257 (76%)	158 (82%)		363 (80%)	52 (71%)	
weiblich	79 (24%)	34 (18%)		92 (20%)	21 (29%)	
Ätiologie						
ASH	99 (29%)	56 (29%)	>0,9	134 (29%)	21 (29%)	>0,9
NASH	27 (8%)	15 (7,8%)	>0,9	34 (7,5%)	8 (11%)	0,3
Hämochromatose	20 (6%)	4 (2,1%)	0,04	23 (5,1%)	1 (1,4%)	0,2
HBV	67 (20%)	31 (16%)	0,3	84 (18%)	14 (19%)	0,9
HCV	78 (23%)	28 (15%)	0,017	92 (20%)	14 (19%)	0,8
BCLC			<0,001			0,8
A	74 (22%)	20 (10%)		79 (17%)	15 (21%)	
B	201 (60%)	138 (72%)		292 (64%)	47 (64%)	
C	34 (10%)	27 (14%)		53 (12%)	8 (11%)	
D	27 (8%)	7 (3,6%)		31 (6,8%)	3 (4,1%)	
ECOG			0,7			>0,9
0-1	320 (96%)	185 (97%)		436 (96%)	69 (97%)	
2	7 (2,1%)	2 (1,1%)		8 (1,8%)	1 (1,4%)	
3	3 (0,9%)	2 (1,1%)		5 (1,1%)	0 (0%)	
4	5 (1,5%)	1 (0,5%)		5 (1,1%)	1 (1,4%)	
Child-Pugh-Score			0,4			0,3
A	130 (52%)	58 (53%)		167 (53%)	21 (45%)	
B	94 (37%)	44 (40%)		115 (37%)	23 (49%)	
C	27 (11%)	7 (6,4%)		31 (9,9%)	3 (6,4%)	
Leberzirrhose			<0,001			0,5
nicht vorhanden	102 (30%)	91 (47%)		164 (36%)	29 (40%)	
vorhanden	234 (70%)	101 (53%)		291 (64%)	44 (60%)	
portale Venenthrombose	34 (10%)	30 (16%)	0,062	56 (12%)	8 (11%)	0,7
Gefäßinvasion			<0,001			0,3
keine	237 (71%)	101 (53%)		294 (65%)	44 (60%)	
mikrovask.	58 (17%)	51 (27%)		89 (20%)	20 (27%)	
makrovask.	41 (12%)	40 (21%)		72 (16%)	9 (12%)	
Tumor-grading			>0,9			0,008
G1	59 (20%)	35 (20%)		83 (20%)	11 (17%)	
G2	166 (56%)	100 (56%)		237 (58%)	29 (44%)	
G3	72 (24%)	43 (24%)		89 (22%)	26 (39%)	
MTM-Subtyp			0,6			<0,001
nein	305 (92%)	174 (93%)		421 (94%)	58 (79%)	

ja	28 (8,4%)	13 (7,0%)		26 (5,8%)	15 (21%)	
VETC			0,011			0,1
negativ	287 (85%)	147 (77%)		369 (81%)	65 (89%)	
positiv	49 (15%)	45 (23%)		86 (19%)	8 (11%)	
GS-Überexpression			<0,001			<0,001
nein	286 (86%)	134 (70%)		352 (77%)	68 (96%)	
ja	48 (14%)	58 (30%)		103 (23%)	3 (4,2%)	

¹ Median (IQR), n (%)

² Wilcoxon-Rangsummentest, Pearson's Chi-Quadrat-Test, exakter Test nach Fisher

Abkürzungen: mikrovask./makrovask. = mikrovaskulär/makrovaskulär; MTM = makrotrabekulär-massiver Subtyp; VETC = *vessels encapsulating tumor clusters*; GS = Glutaminsynthetase

Tab. 7.2: Humanes Probenkollektiv für Immunblot und cDNA-Isolierung für qPCR (HCC und nicht-neoplastisches Lebergewebe)

Probennummer	Alter	Geschlecht	klinische Angabe	Histologie des nicht-neoplastischen Lebergewebes
1	17	weiblich	HCC	Steatose
2	72	männlich	HCC	Fibrose
3	76	männlich	HCC	Fibrose
4	66	männlich	HCC	Entzündungszellen, Fibrose im Randbereich
5	67	männlich	HCC	
6	64	weiblich	Zustand nach Lebertransplantation bei HCC, V.a. Rezidiv	
7	66	männlich	HCC, Leberzirrhose	
8	84	männlich	HCC	Fibrose
9	80	männlich	HCC, V.a. NASH	Steatose (15 % Fett), Entzündungszellen, Fibrose
10	81	weiblich	HCC	Steatose (60 % Fett), Entzündungszellen, Fasersepten
11	66	männlich	HCC-Rezidiv	Steatose (25 % Fett), fokale Fibroseareale
12	79	männlich	HCC	Steatose (25 % Fett), geringe Entzündung, Fibrose
13	71	männlich	V.a. HCC	Steatose (70 % Fett), beginnende septenbildende Fibrose
14	75	männlich	HCC bei Leberzirrhose Child A	Steatose (40 % Fett), Entzündung, Zirrhose

7.3 Kaplan-Meier-Kurven

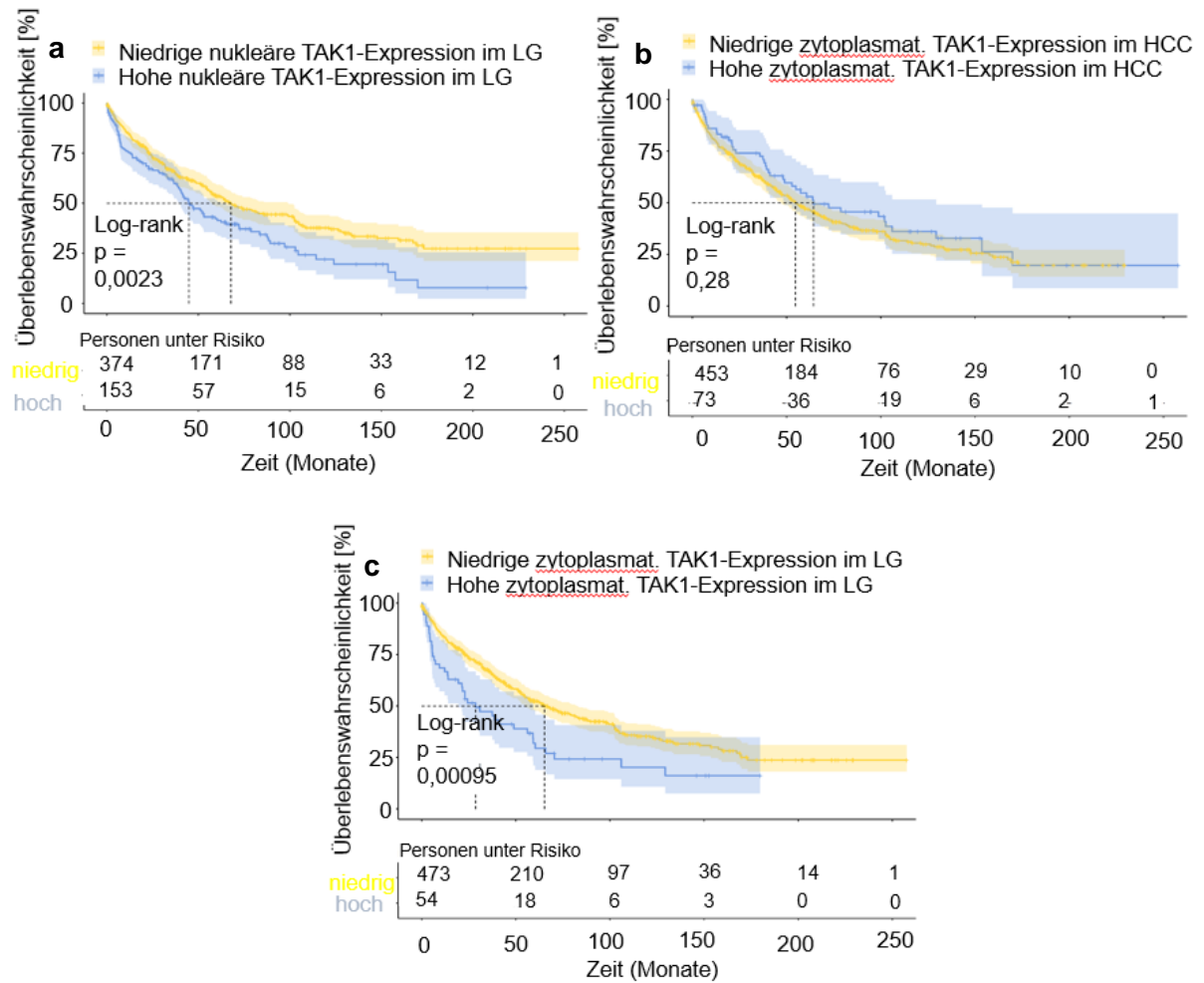


Abb. 7.2: Kaplan-Meier-Analyse der TAK1-Expression in HCCs. Assoziation einer hohen TAK1-Expression mit kürzerem Überleben und schlechter Prognose. a) Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf nukleäre TAK1-Expression im Lebergewebe (LG). HR 1,45; 95%-KI 1,14 bis 1,85; Log-rank 0,002270. b) Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf zytoplasmatische TAK1-Expression im HCC. HR 0,837; 95%-KI 0,604 bis 1,16; Log-rank 0,282000. c) Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Bezug auf zytoplasmatische TAK1-Expression im LG. HR 1,74; 95%-KI 1,25 bis 2,43; Log-rank 0,000947.

8 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Danke an, der als Institutsleiter diese Arbeit ermöglichte. Insbesondere bedanke ich mich herzlich bei meiner Doktormutter, die mir das Schreiben dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mir dabei zu jeder Zeit unterstützend durch die ausgezeichnete Betreuung zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt auch den Betreuern aus der Pathologie und dem Naturwissenschaftler für die große Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Sie waren wirklich jederzeit für mich da!

Dem Biostatistiker, danke ich für das Anfertigen der statistischen Auswertungen und aus der I. Medizinischen Klinik sowie aus der Viszeralchirurgie für das zur Verfügung stellen der klinischen Daten.

Außerdem möchte ich mich beim gesamten Laborteam der Pathologie, besonders bei....., für die Hilfe und das Anfertigen der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Ebenso vielen Dank an das gesamte Team des Forschungslabors für die riesige Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, Materialien und Geräte mitbenutzen zu dürfen.

Danken möchte ich auch den anderen Studierenden der Arbeitsgruppe: für das Überlassen der Lysate und cDNA-Proben, für das Anfertigen von Probe-Immunblots und die Einarbeitung in die Migrations- und Proliferationsassays, für die Einarbeitung zu Beginn und für die viele Hilfe im Labor und die lustige Zeit trotz anstrengender Phasen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Unterstützung und die Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation.

9 Tabellarischer Lebenslauf

